

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

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Том / Volume	№ / No.
23	3-1
2023	

ТЕМА НОМЕРА

**Разработка
и совершенствование
отечественных биологических
лекарственных средств**



www.biopreparations.ru



Уважаемые коллеги!

Главная тема этого номера — «Разработка и совершенствование отечественных биологических лекарственных средств». В современном мире развитая биофармацевтическая промышленность представляет собой важнейший элемент системы обеспечения мер по защите здоровья населения. Именно продукты биотехнологий сегодня наиболее полным образом отвечают на ключевые вызовы здравоохранения. Это в том числе продемонстрировала пандемия COVID-19, темпы распространения которой были существенно замедлены по всему миру благодаря новым вакцинам, иммуноглобулинам и другим биологическим препаратам, созданным и внедренным в практическое здравоохранение в этот период.

С помощью современных биологических препаратов в настоящее время удается контролировать многие социально значимые инфекционные, аутоиммунные и другие заболевания. Развитие производства биопрепаратов тем более важно, что именно такие средства в большей степени, чем, например, продукты химического синтеза, отвечают актуальной парадигме здравоохранения, провозгласившей приоритет профилактики перед лечением. Медицина XXI века стремится не просто излечивать за-

болевания, а поддерживать здоровье на протяжении всей жизни и не допускать тяжелых последствий различных патологий. Решению этой задачи способствует использование вакцин, препаратов крови, аллергенов, бактериофагов и других биологических лекарственных средств. Это требует от производителей не только разработки новых препаратов, предназначенных для диагностики, профилактики и лечения заболеваний, но и совершенствования качества уже выпускаемых продуктов. Отдельно отмечу необходимость реализации политики импортозамещения. Собственное производство полного цикла на территории России — это гарантия стабильного снабжения отечественной системы здравоохранения биопрепаратами, а значит, и обеспечения прав граждан на качественную медицинскую помощь.

В данном номере журнала представлены статьи, которые наглядно демонстрируют, на каких технологических платформах создаются современные вакцины, какие новые методы контроля качества препаратов внедряются в производство, какие инновации находятся на стадии исследований и какие проекты для развития медицины будущего реализуются уже сегодня.

С уважением,
генеральный директор холдинга
«Нацимбио» Госкорпорации Ростех

ЗАГОРСКИЙ Андрей Юрьевич

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

ТОМ 23, № 3–1, 2023

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

Учредитель:

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

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, включен в «Белый список» научных журналов. Журнал принимает статьи по следующим научным специальностям: биотехнология, молекулярная биология, вирусология, микробиология, аллергология и иммунология.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ 1,182.

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

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

VOLUME 23, NO. 3–1, 2023

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

Founder:

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

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

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

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

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

На обложке: Бактериофаг (лицензированное изображение фотобанка ООО «Фотодженика» <https://photogenica.ru/zoom/PHX18902687/>)

Cover image: Bacteriophage, a licensed image from the Photogenica image bank (<https://photogenica.ru/zoom/PHX18902687/>)

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 процессов, стандартизации, контроля качества, производства и применения терапевтических, профилактических и диагностических биологических лекарственных препаратов – иммунобиологических, биотехнологических, генотерапевтических и лекарственных препаратов, полученных из плазмы крови человека и животных; а также различных групп иммуномодулирующих лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов.

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия)

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

Миронов Александр Николаевич, д-р мед. наук, проф., ООО «Национальное агентство лекарственных средств» (Москва, Россия)

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

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

Пашенко Юрий Иванович, д-р биол. наук, проф., ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

Токарев Николай Константинович, д-р мед. наук, проф., ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» (Санкт-Петербург, Россия)

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

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

Учредитель и издатель

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Шеф-редактор

Федотова Ольга Федоровна
+7 (495) 121-06-00 (доб. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

**Ответственный редактор
тематического выпуска**
Загорский Андрей Юрьевич

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

13.10.2023

Дата выхода в свет

20.10.2023

Подписной индекс

в каталоге «Пресса России» – 57941,
в каталоге агентства «Урал-Пресс» –
57941

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

© Составление. Оформление.
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,
2023

СОДЕРЖАНИЕ

Тема номера:

**Разработка и совершенствование отечественных
биологических лекарственных средств**

Е.И. Саканян, М.А. Ясная, В.Ф. Вуль, Р.А. Бубенчиков,
Н.В. Винокурова, Е.С. Юртаева
**Лекарственные препараты пыльцевых аллергенов:
современные аспекты стандартизации 367**

А.М. Николаева, Н.А. Ковязина, Е.В. Функнер,
А.Н. Красильникова, К.А. Лыско
**Изучение биофармацевтических свойств препарата
поливалентного бактериофага в капсулированной
лекарственной форме 379**

О.В. Стронин, А.А. Епанчинцев, А.А. Колтунов
Изучение вакцины против клещевого энцефалита 389

Н.В. Зубкова, А.М. Николаева, А.В. Иванов, О.В. Белякова,
М.В. Разумихин, Н.В. Винокурова, И.С. Ефимова, Т.И. Смолянова,
Е.И. Саканян
**Разработка оптимальных условий нанофильтрации
в технологии производства иммуноглобулина G человека
нормального для внутривенного введения 400**

М.В. Томилин, Т.В. Короткова, П.А. Логинов
**Сравнительный анализ показателей качества
лекарственного препарата альбумина человека
с измененным стабилизирующим составом 411**

В.А. Несчислаев, Е.Г. Шилова, А.М. Николаева, Е.В. Орлова
**Изучение свойств комплексного биопрепарата
с антибактериальной и пробиотической активностью 422**

С.А. Лазарев, Н.О. Вартанова, А.В. Поддубиков, Н.А. Михайлова
**Исследование пробиотической активности метаболитов
бактерий *Bacillus subtilis* при экспериментальном дисбиозе
у мышей 431**

А.В. Нечаев, Э.Ю. Кудашева, Е.Л. Постнова, Р.А. Волкова,
О.В. Фадейкина, И.В. Борисевич, А.А. Мовсесянц
**Особенности разработки, аттестации и применения
фармакопейного стандартного образца содержания
иммуноглобулинов класса А в препаратах иммуноглобулинов
человека для парентерального применения 443**

О.В. Фадейкина, А.А. Воропаев, Д.С. Давыдов, Р.А. Волкова
**Оценка неопределенности результатов измерений
при определении потери в массе при высушивании
биологических лекарственных препаратов 452**

Е.В. Эльберт, В.В. Ножко, Р.А. Волкова, А.А. Мовсесянц,
В.А. Меркулов, В.В. Косенко
**К вопросу оценки вирусной безопасности индивидуальных
единиц субстанции «Плазма человека для фракционирования»
методом амплификации нуклеиновых кислот 463**

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Editor-in-Chief

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

Deputy Editors-in-Chief

Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency (Moscow, Russia)

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

Executive Secretary

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

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

Editorial Board

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

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

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

Mikhail K. Bakulin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Federal Medical Biological Agency of Russia (Moscow, Russia)

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

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

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

Aleksandr L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, 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 Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology (Obolensk, Moscow Region, Russia)

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

Vyacheslav B. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency (Moscow, Russia)

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

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

Diana T. Levi, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

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

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

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

Vyacheslav D. Mosyagin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

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

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

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

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

Founder and publisher

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

Managing Editor

Olga F. Fedotova

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

Fedotovaof@expmed.ru

Guest editor for the special issue

Andrey Yu. Zagorskiy

Science Editor

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

Elena A. Orlova-Yar

Translation Editor

Liubov A. Baltina

Postal address of the founder and editorial office

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051

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

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

biopreparaty@expmed.ru

Contract publisher

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

Printing office

Triada Publishing House LLC:

9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver

170034

Print run

150 copies. Free price

Passed for printing

13 October 2023

Date of publication

20 October 2023

Subscription codes

Pressa Rossii catalogue: 57941

Ural-Press agency catalogue: 57941

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

© Compilation, design. Scientific Centre
for Expert Evaluation of Medicinal
Products, 2023

CONTENTS

Issue topic

Development and improvement of russian biologicals

E.I. Sakanyan, M.A. Yasnaya, V.F. Vul, R.A. Bubenchikov, N.V. Vinokurova, E.S. Yurtaeva	
Pollen allergen products: current standardisation issues	367
A.M. Nikolaeva, N.A. Kovyazina, E.V. Funkner, A.N. Krasilnikova, K.A. Lysko	
Biopharmaceutical properties of polyvalent bacteriophage capsules	379
O.V. Stronin, A.A. Epanchintsev, A.A. Koltunov	
Study of a tick-borne encephalitis vaccine	389
N.V. Zubkova, A.M. Nikolaeva, A.V. Ivanov, O.V. Beliakova, M.V. Razumikhin, N.V. Vinokurova, I.S. Efimova, T.I. Smolyanova, E.I. Sakanyan	
Determination of optimum nanofiltration conditions for the manufacturing process of human normal immunoglobulin G for intravenous administration	400
M.V. Tomilin, T.V. Korotkova, P.A. Loginov	
Comparative analysis of quality attributes of a human albumin preparation with a modified stabilising composition	411
V.A. Neschislyaev, E.G. Shilova, A.M. Nikolaeva, E.V. Orlova	
Study of a combined biological product with antibacterial and probiotic activity	422
S.A. Lazarev, N.O. Vartanova, A.V. Poddubikov, N.A. Mikhailova	
Probiotic activity of <i>Bacillus subtilis</i> metabolites in experimentally induced dysbiosis in mice	431
A.V. Nechaev, E.Yu. Kudasheva, E.L. Postnova, R.A. Volkova, O.V. Fadeikina, I.V. Borisevich, A.A. Movsesyants	
Development, certification, and use of a pharmacopoeial standard for the content of immunoglobulin A in human immunoglobulins for parenteral administration	443
O.V. Fadeikina, A.A. Voropaev, D.S. Davydov, R.A. Volkova	
Estimation of measurement uncertainty for the determination of loss on drying of biologicals	452
E.V. Elbert, V.V. Nozhko, R.A. Volkova, A.A. Movsesyants, V.A. Merkulov, V.V. Kosenko	
On assessing the viral safety of individual units of the substance "Human plasma for fractionation" by nucleic acid amplification	463



Лекарственные препараты пыльцевых аллергенов: современные аспекты стандартизации

Е.И. Саканян¹, М.А. Ясная², В.Ф. Вуль^{2,✉}, Р.А. Бубенчиков¹, Н.В. Винокурова¹,
Е.С. Юртаева¹

¹ Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», 2-й Волконский переулок, д. 10, Москва, 127473, Российская Федерация

² НПО «Аллерген», филиал АО «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», ул. Биологическая, д. 20, Ставрополь, 355019, Российская Федерация

✉ Вуль Всеволод Феликсович; v.f.vul@microgen.ru

Резюме

Актуальность. Лекарственные препараты пыльцевых аллергенов являются наиболее востребованными. Терапевтическая польза от их применения зависит от стандартизации. Для повышения эффективности диагностики и лечения аллергических заболеваний необходимы современные методы оценки специфической (аллергенной) активности лекарственных препаратов пыльцевых аллергенов с применением стандартных образцов и методов физико-химического анализа.

Цель. Разработка методологических подходов к стандартизации лекарственных препаратов пыльцевых аллергенов для перехода к нормированию специфической активности в единицах аллергенной активности (ЕАА) и приведения качества препаратов в соответствие с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Материалы и методы. Использовали стандартные образцы пыльцевых аллергенов (АО «НПО «Микроген»), стандарт ВОЗ аллергена из пыльцы тимотея посевной, набор стандартов для эксклюзионной хроматографии MW 1350–670000 Da, бычий сывороточный альбумин, специфические IgE-содержащие сыворотки крови от лиц, сенсибилизированных к исследуемому аллергену, меченые антитела к IgE человека, стандартные образцы летучих растворителей для газовой хроматографии. Подтверждение подлинности стандартного образца предприятия аллергенной активности аллергена (СОП ААА) проводили методом вестерн-блота (аллергенные компоненты), содержание общего белка определяли колориметрически (метод Бредфорда). Дополнительно для изучения белковых фракций применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Количество остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов оценивали при помощи газожидкостной хроматографии.

Результаты. Вместо существующей ранее неспецифической характеристики аллергенной активности в единицах белкового азота (Protein Nitrogen Unit, PNU) был разработан и апробирован новый метод контроля специфической активности в ЕАА на основе конкурентного иммуноферментного анализа (КИФА). Разработана и валидирована методика контроля аллергенной активности *in vitro* на основе КИФА. Проведены разработка и аттестация 15 первичных СОП ААА с присвоением им аллергенной активности в ЕАА/мл по результатам тестирования методом кожных проб *in vivo*. Выполнен анализ экспериментальных данных с целью установления норм аллергенной активности для номенклатуры пыльцевых аллергенов, выпускаемых АО «НПО «Микроген». Разработаны и валидированы в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации физико-химические методы аттестации СОП ААА. Определены условия хроматографического разделения

остаточных органических растворителей (ацетона, диэтилового эфира) и параметры пригодности хроматографической системы. Проведена аттестация вторичных СОП ААА методом КИФА по показателю аллергенной активности относительно первичных СОП, что позволило перейти к стандартизации препаратов аллергенов методом *in vitro*.

Выводы. Разработана методология стандартизации препаратов аллергенов методом КИФА по степени ингибирования иммунологической реакции в сравнении со стандартным образцом. Обоснована целесообразность исключения показателя «Содержание белкового азота» (в единицах белкового азота, PNU) и замены его на показатель «Аллергенная активность» (в ЕАА). Полученные СОП ААА впервые на предприятии были аттестованы в ЕАА. Разработана и валидирована аналитическая методика определения количественного содержания остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов с помощью метода газожидкостной хроматографии.

Ключевые слова: лекарственные препараты пыльцевых аллергенов; специфическая активность; остаточные органические растворители; общий белок; КИФА

Для цитирования: Саканян Е.И., Ясная М.А., Вуль В.Ф., Бубенчиков Р.А., Винокурова Н.В., Юртаева Е.С. Лекарственные препараты пыльцевых аллергенов: современные аспекты стандартизации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):367–378. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-367-378>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

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

Pollen allergen products: current standardisation issues

Elena I. Sakanyan¹, Maria A. Yasnaya², Vsevolod F. Vul^{2✉}, Roman A. Bubenchikov¹, Natalya V. Vinokurova¹, Ekaterina S. Yurtaeva¹

¹ Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, 10 2nd Volkonsky Ln., Moscow 127473, Russian Federation

² Allergen, Branch of Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, 20 Biologicheskaya St., Stavropol 355019, Russian Federation

✉ Vsevolod F. Vul; v.f.vul@microgen.ru

Abstract

Scientific relevance. Pollen allergen medicines are in high demand, and their therapeutic benefits directly correlate with their standardisation. Better diagnosis and treatment of allergic diseases require state-of-the-art procedures for assessing the allergenic activity of pollen allergen products using reference standards and physicochemical testing methods.

Aim. The study aimed at developing methodological approaches to the standardisation of pollen allergen products in order to shift to measuring their potency in allergenic activity units (AAU) and bring their quality in line with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

Materials and methods. The study used pollen allergen reference standards by Microgen, the WHO International Standard for timothy grass (*Phleum pratense*) pollen extract, a gel filtration standard kit of molecular weight markers ranging from 1.35 to 670 kDa, bovine serum albumin, serum samples with specific IgE obtained from donors sensitised to the study pollen allergens, labelled anti-human IgE antibodies, and reference standards for determining residual volatile solvents by gas chromatography. The identification of in-house reference standards for the potency of pollen allergens involved Western blotting (for allergenic components). The total protein content was determined by Bradford's assay. In addition, the authors used high-performance liquid chromatography to study protein fractions and gas-liquid chromatography to determine the content of residual organic solvents.

Results. To substitute the existing method of non-specific characterisation of allergenic activity in protein nitrogen units (PNU), the authors developed and tested a new method to control allergenic activity in allergenic activity units (AAU) based on an *in vitro* competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedure developed and validated in this study. Furthermore, the authors developed and certified 15 primary in-house reference standards with allergenic activity established in AAU/mL using skin tests *in vivo*. The experimental data were analysed to standardise the allergenic activity of the pollen allergens manufactured by Microgen. The authors developed physicochemical methods for the certification of in-house reference standards and validated these methods in accordance with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. The study involved selecting chromatographic separation conditions for residual organic solvents (acetone and diethyl ether) and establishing system suitability criteria for the chromatographic system. The allergenic activity of secondary in-house reference standards was certified against that of primary in-house reference standards using competitive ELISA. Thus, the authors managed to shift to the standardisation of pollen allergen products *in vitro*.

Conclusions. The authors developed their competitive ELISA-based method to standardise pollen allergen products by comparing the inhibition of immune responses to a product and a standard. The study demonstrated the feasibility of substituting allergenic activity quantification (in AAU) for protein nitrogen content determination (in PNU) and showed the first example of using AAU for the certification of in-house reference standards. Additionally, the authors developed and validated an analytical procedure for determining the content of residual organic solvents in pollen allergen products by gas-liquid chromatography.

Key words: medicinal products of pollen allergens; potency; allergenic activity; residual organic solvents; total protein; competitive enzyme-linked immunosorbent assay

For citation: Sakanyan E.I., Yasnaya M.A., Vul V.F., Bubenchikov R.A., Vinokurova N.V., Yurtaeva E.S. Pollen allergen products: current standardisation issues. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3-1):367–378. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-367-378>

Funding. The study was performed without external funding.

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

Введение

В настоящее время перед национальными системами здравоохранения остро стоит проблема профилактики и лечения аллергических заболеваний, которым подвержена значительная часть населения земного шара [1–4]. По некоторым оценкам, 20–30% от общего числа населения планеты имеют аллергические заболевания [5]. Наряду с известными ранее видами аллергии (на пищу, растения, домашнюю и библиотечную пыль, шерсть диких и домашних животных и др.) появилась и становится все более распространенной медикаментозная аллергия (на лекарственные средства). С 1960-х годов, особенно в последние 10–20 лет, наблюдается стремительный рост числа пациентов с аллергическими заболеваниями. Проявления аллергических заболеваний приводят к ухудшению качества жизни, ограничивают возможности во всех сферах социальной и личной жизни. Аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) – современный метод лечения аллергии, в основе которого лежит использование механизма и патогенеза аллергических заболеваний [6–9]. Принцип

АСИТ – поэтапное введение в организм пациента возрастающих доз аллергенсодержащего лекарственного препарата (ЛП) для снижения чувствительности к аллергену [6, 10].

Следует отметить, что преобладающие позиции (от 1 до 5% от общего числа аллергических заболеваний) занимают аллергические реакции на растительную пыльцу, при этом их проявления разнообразны, а признаки ринита могут отсутствовать [11]. Для проведения АСИТ используют ЛП на основе действующих веществ – аллергенов и аллергоидов, которые произведены из пыльцы растений и вызывают положительный аллергический ответ [8].

Обеспечение качества, эффективности и безопасности ЛП аллергенов – ключевая задача производителя, которая требует внедрения не только современных технологий, но и соответствующих методов стандартизации и последующего контроля качества ЛП аллергенов. Это подразумевает переход от оценки специфической активности ЛП аллергенов с использованием методов *in vivo* (кожные пробы) к методу определения аллергенной активности *in vitro*

относительно стандартных образцов (СО), аттестованных в единицах аллергенной активности (ЕАА/мл) с помощью разработанных и валидированных методик конкурентного иммуноферментного анализа (КИФА).

На сегодняшний день единой международной системы единиц аллергенной активности не существует, и мировые производители лекарственных средств переходят на использование различных унифицированных единиц аллергенной активности. Это позволяет количественно оценить специфическую активность ЛП аллергенов и исходных фармацевтических субстанций (табл. 1) [1].

Анализ данных таблицы 1 позволяет сделать заключение о том, что практически во всех представленных вариантах проводится сравнительная оценка результатов кожных проб и далее их перевод в единицы специфической (аллергенной) активности.

Всемирная организация здравоохранения предложила к использованию ограниченное число международных стандартов аллергенных экстрактов [12]. Перечень международных СО включает лишь пять наименований, что создает очевидные сложности для стандартизации лекарственных средств аллергенов и по-

Таблица 1. Характеристика единиц аллергенной активности лекарственных препаратов аллергенов (таблица составлена авторами по данным источника [1])

Table 1. Units of allergenic activity of pollen allergen products (compiled by the authors based on [1])

Единица аллергенной активности <i>Unit of allergenic activity</i>	Характеристика <i>Description</i>	Регион применения / Регуляторный орган / Компания <i>Region / Regulatory authority / Company</i>
BAU — биоэквивалентная аллергенная единица <i>BAU, Bioequivalent Allergenic Unit</i>	100 000 BAU эквивалентны разведению аллергена 3×10^{-14} , при котором размер эритемы достигает 50 мм у каждого испытуемого (15–20 пациентов) <i>100,000 BAU are equivalent to the 3×10^{-14} dilution of the allergen with an erythema diameter sum of 50 mm in each patient (15–20 patients)</i>	FDA (США) <i>FDA (USA)</i>
HEP — гистаминоэквивалентная единица/ BU, биологические единицы <i>HEP, Histamine Equivalent Prick unit/ BU, Biological Unit</i>	HEP — единица, соответствующая развитию кожной реакции (15–20 пациентов), эквивалентной таковой при воздействии раствора гистамина в концентрации 10 мг/мл, приравняется к 1000 BU (биологических единиц) <i>A HEP unit corresponds to the allergen concentration that elicits the same wheal size in skin prick testing as the histamine dihydrochloride control at 10 mg/mL. 1 HEP unit is equivalent to 1000 biological units (BU)</i>	FDA (США), ALK-Abello (Дания) <i>FDA (USA), ALK-Abello (Denmark)</i>
JSK — единица стандартного качества <i>JSK, standard quality unit (Jednotka Standardní Kvality)</i>	Прик-тест (20 пациентов) <i>Prick testing (20 patients)</i>	Sevapharma (Чехия) <i>Sevapharma (Czech Republic)</i>
IR — индекс реактивности <i>IR, Index of Reactivity</i>	100 IR соответствуют дозе аллергена, вызывающего развитие кожной реакции (папула диаметром 7 мм). Прик-тест (30 пациентов) <i>Prick testing with three serial dilutions, 30 patients, and a 9% codeine phosphate control. 100 IR is equal to the allergen dose that elicits a wheal with a diameter of 7 mm</i>	Stallergenes Greer (Франция) <i>Stallergenes Greer (France)</i>
BU — биологические единицы <i>BU, Biological Unit</i>	Накожные пробы (30 пациентов). 100 BU соответствуют дозе аллергена, вызывающего развитие кожной реакции (папула диаметром 7 мм) <i>Prick testing (30 patients) 100 BU correspond to the allergen dose that elicits a wheal with a diameter of 7 mm</i>	Страны Северной Европы <i>Nordic countries</i>
UBE — единицы биологических эквивалентов <i>UBE, biological equivalent units (Unidades Biológicas Equivalentes)</i>	Двойной прик-тест (три серийных разведения, 30 пациентов). Концентрация раствора гистамина — 0,1 мг/мл <i>Double prick test with three serial dilutions, 30 patients, and a 0.1 mg/mL histamine solution</i>	IPI-Asac (Испания) <i>IPI-ASAC (Spain)</i>
ЕАА — единицы аллергенной активности <i>AAU, Allergenic Activity Units</i>	100 000 ЕАА соответствуют значению разведения, которое вызывает развитие кожной реакции у сенситизированных пациентов в виде папулы (8 мм) ^a <i>100,000 AAU correspond to the dilution that elicits a wheal^a with a diameter of 8 mm in sensitised patients</i>	АО «НПО «Микроген» (Российская Федерация) <i>Microgen (Russian Federation)</i>

^a ОФС.1.7.2.0040.18 Определение специфической (аллергенной) активности аллергенов и алергоидов методом кожных проб. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

^a OFS.1.7.2.0040.18 Determination of potency (allergenic activity) of allergens and allergoids by prick testing. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. V. 2. Moscow; 2018.

следующего рутинного контроля их качества, подтверждающего единообразие аллергенной активности. В связи с этим перед производителями встает вопрос разработки собственных первичных и вторичных стандартных образцов предприятий (СОП), предназначенных для использования при контроле качества с применением метода КИФА.

Цель работы — разработка методологических подходов к стандартизации лекарственных препаратов пыльцевых аллергенов для перехода к нормированию специфической активности в единицах аллергенной активности (ЕАА) и приведения качества препаратов в соответствие с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ).

Задачи исследования:

- разработка первичных СОП аллергенной активности аллергена (СОП ААА) для выпускаемой АО «НПО «Микроген» номенклатуры аллергенов, установление норм их аллергенной активности;
- разработка и валидация методики КИФА контроля аллергенной активности *in vitro*;
- разработка и валидация хроматографических методов для подтверждения подлинности и показателей качества выпускаемой продукции;
- аттестация вторичных СОП ААА с использованием разработанных методов, переход к стандартизации препаратов аллергенов *in vitro*.

Материалы и методы

Материалы

1. СОП ААА из пыльцы ржи посевной, тимopheевки луговой, полыни горькой, березы висячей, ежи сборной, орешника (лещины обыкновенной), дуба черешчатого, ольхи клейкой, амброзии полыннолистной, овсяницы луговой, костра прямого, мятлика лугового, подсолнечника однолетнего, одуванчика лекарственного, цикламена дурнишниковидной, а также соответствующие аллергенные пыльцевые экстракты (маточные), изготовленные по действующему промышленному регламенту. Производитель: НПО «Аллерген», Ставрополь (филиал АО «НПО «Микроген»).
2. WHO International Standard Timothy Pollen Extract — международный стандарт аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (Нацио-

нальный институт биологических стандартов и контроля, NIBSC), код 82/520, активность 100 000 IU (ME) / ампула [13]. Стандарт восстанавливали в 1 мл деионизированной воды до концентрации 100 000 IU/мл. Для последующего анализа использовали восстановленный стандарт тимopheевки луговой в концентрации 10 000 IU/мл.

3. Стандарт для эксклюзионной хроматографии Gel Filtration Standard, молекулярная масса 1,350–670,000 кДа, рI 4,5–6,9 (Bio-Rad Labs, США, кат. № 151–1901).
4. Бычий сывороточный альбумин, фракция V A6588,0100 (AppliChem, Германия).
5. Сыворотки крови пациентов, содержащие IgE-антитела (положительные) к аллергенам из пыльцы (класс 3–4 специфической активности).
6. Конъюгат антител моноклональных диагностических против тяжелых (эпсилон) полипептидных цепей иммуноглобулинов (IgE) человека, меченных пероксидазой хрена (ООО «Полигност», Россия).
7. Стандартные образцы диэтилового эфира, ацетона и растворителя диметилсульфоксида, для газожидкостной хроматографии (Merck KGaA, Германия), чистота не менее 99,9%.

Методы

Электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн-блот. Испытания СОП ААА проводили согласно требованиям ОФС.1.7.1.0001.15¹ по показателям: «Белковый профиль» (электрофорез в полиакриламидном геле — ПААГ, ВЭЖХ) и «Подлинность» (вестерн-блот). Электрофорез в ПААГ (15%) с натрия додецилсульфатом (SDS) в восстанавливающих условиях (в присутствии дитиотреитола) проводили с использованием системы для вертикального электрофореза Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad Labs, США, кат. № 165–8004) [2]. Приготовление 15% ПААГ, электрофорез, окрашивание ПААГ красителем Coomassie R-250 (Serva, Германия, кат. № 1752501) осуществляли в соответствии с ОФС.1.2.1.0023.15². Определение подлинности выполняли методом вестерн-блота в присутствии аллерген-специфических сывороток в соответствии с ОФС.1.7.2.0022.15³. Образцы концентрировали с помощью микроконцентраторов Amicon Ultra-0.5 (Merck, Германия, #UFC5010BK).

¹ ОФС.1.7.1.0001.15 Аллергены. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

² ОФС.1.2.1.0023.15 Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

³ ОФС.1.7.2.0022.15 Определение подлинности и чистоты иммунобиологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

Эксклюзионная хроматография. Хроматографический анализ аллергенных пыльцевых экстрактов (кандидатов в СОП ААА) проводили при соблюдении фармакопейных требований методом эксклюзионной хроматографии в изократическом режиме элюирования. Для анализа использовали хроматографическую систему Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Германия) с колонкой Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare, Швеция). Для детекции применяли флуориметрический детектор в режиме длин волн возбуждения (испускания) $\lambda_{\text{ex}}=280$ ($\lambda_{\text{em}}=345$) нм. Элюирование выполняли фосфатным буферным раствором с концентрацией 10 мМ (рН 6,8), содержащим натрия хлорида (0,4 М) и Твин 20 (0,02%), модифицированным ацетонитрилом (соотношение фосфатного буферного раствора и ацетонитрила 4:1), со скоростью 0,5 мл/мин. Объем ввода — 50 мкл. Образцы аллергенных препаратов, представляющие собой водно-солевые растворы белково-полисахаридных комплексов, выделенных из пыльцы растений экстрагированием фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,0), с содержанием белкового азота от 7500 до 12 500 PNU/мл, использовали без предварительной пробоподготовки. Приготовление стандарта для эксклюзионной хроматографии проводили в соответствии с рекомендациями производителя, затем развели в 100 раз в подвижной фазе. Раствор бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 1 мг/мл готовили методом точной навески, развели в подвижной фазе до концентрации 0,025 мг/мл [2].

Метод конкурентного иммуноферментного анализа. Биологическая активность первой серии СОП ААА должна быть подтверждена методом кожных проб (тест *in vivo*) в ходе клинических исследований у лиц, сенсibilизированных к исследуемому аллергену, с выражением результата в единицах аллергенной активности (ЕАА/мл)⁴. Биологическую активность второй (и последующих) серии СОП ААА оценивали методом КИФА *in vitro* с использованием специфических сывороток, содержащих IgE-антитела, относительно действующих (первичной и последующих) серий СОП ААА. Исследуемый аллерген связывается со специфическими IgE-антителами

и ингибирует их взаимодействие с СОП ААА, иммобилизованным на твердой фазе. Степень ингибирования прямо пропорциональна содержанию аллергена в растворе. Предварительно СОП ААА и образец анализируемой серии развели в 5 раз, затем последовательно с шагом в 2 раза готовили до 6 разведений, к которым добавляли содержащие IgE-антитела специфические сыворотки, относительно действующих (первичной и последующих) серий СОП ААА. Образовавшиеся на твердой фазе иммунные комплексы связывали с конъюгатом моноклональных антител к IgE человека, меченных пероксидазой хрена (ООО «Полигност», Россия). После инкубации останавливали реакцию внесением раствора тетраметилбензидина и проводили учет результатов КИФА на фотометре iMark (Bio-Rad Labs, США) для микропланшетов при длине волны 450 нм, относительно воздуха в пустой лунке.

Кожные пробы. Определение специфической (аллергенной) активности первой серии СОП проводили в соответствии с рекомендованной методикой ОФС.1.7.2.0040.18⁵. Учитывали кожную реакцию — волдыри, а также гиперемия у людей с повышенной чувствительностью к исследуемому аллергену в анамнезе (или без таковой у представителей контрольной группы). Использовали метод постановки кожных проб (прик-тест и скарификация) у 15–20 лиц, сенсibilизированных к исследуемому аллергену, в возрасте от 18 до 60 лет в период ремиссии заболевания (риноконъюнктивит, бронхит, бронхиальная астма).

Клинические исследования проводили с соблюдением норм и требований, изложенных в международных и российских законодательных актах, регулирующих вопросы биоэтики и защиты прав пациента⁶. Испытания проводили в соответствии с Решением Совета ЕЭК № 79 от 03.11.2016⁷. Исследования рассмотрены и одобрены на заседаниях Комитета по этике АНО «Научно-исследовательский институт общественного здоровья», заседания проводились на базе СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 43» (выписка из протокола № 1 от 17.08.2018, выписка из протокола № 1-25/05/18 от 25.05.2018, выписка из протокола № 2-25/05/18 от 25.05.2018). На проведение клинических исследований

⁴ ОФС.1.7.2.0040.18 Определение специфической (аллергенной) активности аллергенов и алергоидов методом кожных проб. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

⁵ Там же.

⁶ Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации. Этические принципы медицинских исследований с привлечением человека. Форталеа; 2013. http://acto-russia.org/index.php?option=com_content&task=view&id=21

⁷ Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 79 от 03.11.2016 «Об утверждении Правил надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза». <https://docs.cntd.ru/document/456026110>

получены разрешения Минздрава России № 652 от 14.12.2017, № 674–680 от 21.12.2017, № 24–26 от 24.01.2018, № 70, 71 от 20.02.2018, № 73, 76, 77 от 21.02.2018, № 64 от 02.02.2022.

Определение остаточных органических растворителей (ацетон, диэтиловый эфир). Согласно ОФС 1.1.0008.15⁸ содержание органических растворителей в ЛП аллергенов не должно быть более 0,5% (5000 ppm). Определение проводили методом газовой хроматографии в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0004.15⁹.

Для разработки аналитической методики определения количественного содержания ацетона и диэтилового эфира и ее валидации использовали следующее оборудование:

- кварцевая колонка Zebtron ZB-624, длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 1,8 мкм (кат. № 1023593);
- газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором «Кристаллюкс-4000М» (ООО «НПФ Мета-хром», Россия).

Регистрировали хроматограммы растворителя (вода для инъекций), испытуемого образца ЛП аллергена, раствора СО ацетона и диэтилового эфира, измеряли время удерживания и площади пиков. Площади пиков ацетона и диэтилового эфира на хроматограмме испытуемого образца аллергена не должны превышать соответствующие площади на хроматограммах растворов СО.

Результаты и обсуждение

Исследование состояло из следующих этапов:

- разработка и аттестация первичных СОП ААА для номенклатуры аллергенов с присвоением аллергенной активности в ЕАА/мл по результатам тестирования методом кожных проб *in vivo*;
- разработка методик КИФА контроля аллергенной активности *in vitro* и их валидация;
- анализ экспериментальных данных с целью установления норм аллергенной активности для пыльцевых аллергенов, выпускаемых АО «НПО «Микроген»;
- разработка и валидация физико-химических методик аттестации СОП ААА, регламентированных ГФ РФ;

- внесение изменений в нормативную документацию аллергенов, выпускаемых АО «НПО «Микроген»;
- контроль стабильности по показателю аллергенной активности (испытание 3-х экспериментальных серий препаратов аллергенов);
- аттестация вторичных СОП ААА методом КИФА относительно первичных СОП по показателю аллергенной активности, т.е. переход к стандартизации ЛП аллергенов методом *in vitro*.

Производство и аттестация стандартных образцов предприятия лекарственных препаратов аллергенов

Стандартный образец предприятия аллергенной активности представляет собой одну из серий аллергенного экстракта или готового препарата.

Аттестуемая характеристика первичного СОП – аллергенная активность. Устанавливается в рамках проведения клинических исследований в соответствии с ОФС 1.7.2.0040.18¹⁰.

Аллергенную активность в настоящей работе выражали в ЕАА/мл, при этом в качестве активности 100 000 ЕАА/мл принимали значение разведения, которое вызывает развитие кожной реакции у сенсibilизированных лиц в виде волдыря диаметром 8 мм. Расчет аллергенной активности СОП ААА и статистическую обработку данных проводили в соответствии с ОФС.1.7.2.0040.18¹¹ и ОФС.1.1.0013.15¹² (результаты представлены в табл. 2).

Дополнительные исследуемые характеристики (метод): белковый профиль (ВЭЖХ), белковый профиль (электрофорез), подлинность (вестерн-блот). Выявлены полосы преципитации белков с ожидаемыми для главных и второстепенных аллергенных компонентов M_r в области 45–65, 27–35 и менее 20 кДа. Полученные профили специфических аллергенных компонентов показали высокую степень сходства образцов производства АО «НПО «Микроген» с международным стандартом аллергена из пыльцы тимотеи луговой (NIBSC code: 82/520) (рис. 1).

Данный СОП ААА предназначен для аттестации последующих серий СО и контроля текущих производственных серий препаратов методом

⁸ ОФС.1.1.0008.15 Остаточные органические растворители. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁹ ОФС.1.2.1.2.0004.15 Газовая хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

¹⁰ ОФС.1.7.2.0040.18 Определение специфической (аллергенной) активности аллергенов и алергоидов методом кожных проб. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018

¹¹ Там же.

¹² ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

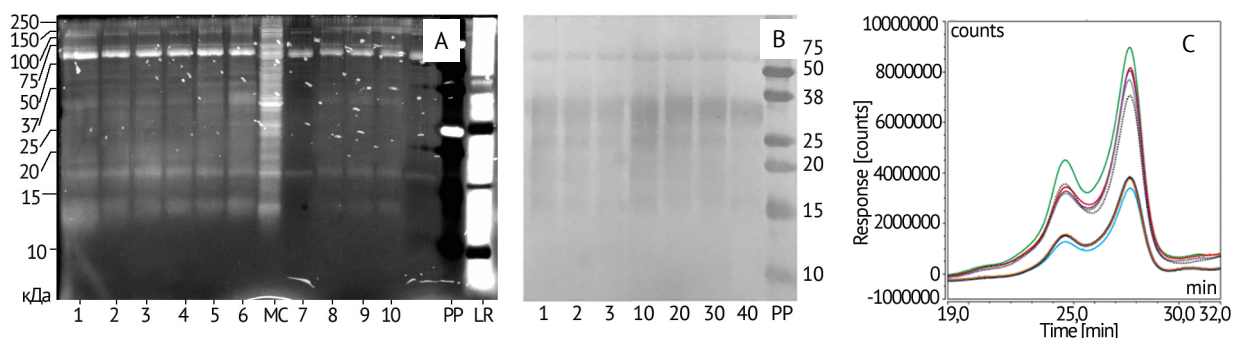


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Белковый и аллергенный профили производственных серий лекарственного препарата аллергена из пыльцы тимового луга: А – электрофорез в полиакриламидном геле; В – вестерн-блот; аллергенные специфические компоненты в виде полос преципитации; 1–6, 7–10 – производственные серии (А, В); 10–40 – маточные экстракты (В); С – ВЭЖХ. МС – Международный стандарт 82/520; PP, LR – маркеры молекулярных масс; производственные серии: голубым цветом – C2301, синим – C2302, оранжевым – C2310, зеленым – C2310, красным – C2311, фиолетовым – C2312, серым – C2314, черным – C2315.

Fig. 1. Protein and allergenic profiles of production batches of a timothy grass pollen allergen product. A, polyacrylamide gel electrophoresis; B, Western blot; Specific allergen components as precipitation bands; 1–6 and 7–10, production batches; 10–40, stock extracts (A, B). C, high-performance liquid chromatography. IS, International Standard (NIBSC code: 82/520); PP, LR, molecular weight markers. Production batches: cyan, C2301; blue, C2302; orange, C2310; green, C2310; red, C2311; purple, C2312; grey, C2314; and black, C2315.

кИФА для определения аллергенной активности *in vitro*.

Активность испытуемой серии в единицах ЕАА устанавливали относительно СОП ААА по степени ингибирования иммунологической реакции при добавлении аллерген-специфических сывороток (табл. 2). Данные методы позволили провести аттестацию первичных СОП аллергенной активности ряда пыльцевых аллергенов по показателю «Специфическая активность».

При последующей аттестации вторичных СОП использовали аттестованные значения СОП пыльцевых аллергенов.

Была приведена в соответствие с XIV изданием ГФ РФ нормативная документация для 15 исследуемых аллергенов (табл. 2).

Разработка аналитической методики определения количественного содержания остаточных органических растворителей в лекарственных препаратах аллергенов

В технологическом процессе при производстве ряда ЛП пыльцевых аллергенов используются органические растворители класса токсичности 3 – диэтиловый эфир и (или) ацетон, предельно допустимое содержание которых не должно превышать 0,5% (5000 ppm).

Количество остаточных органических растворителей в ЛП аллергенов определяли при помощи метода газожидкостной хроматографии и разработанной аналитической методики.

В результате исследований были определены оптимальные условия хроматографического разделения ацетона и диэтилового эфира на капиллярной кварцевой колонке газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектором. Расход воздуха в детекторе – 400 мл/мин, водорода – 40 мл/мин.

Характеристики капиллярной кварцевой колонки Zebron ZB-624 (кат. № 1023593): длина – 30 м, внутренний диаметр – 0,32 мм, толщина пленки – 1,8 мкм; скорость подачи газа-носителя (гелий) – 1,5 мл/мин; деление потока – 50:1; начальная температура термостата колонки +40 °С (в течение 5 мин), подъем температуры до +240 °С со скоростью 25 °С/мин, затем выдержка в течение 1 мин; температура инжектора +250 °С; температура детектора +260 °С; объем вводимого испытуемого раствора – 1,0 мкл; время хроматографирования – 14 мин [14].

Определены параметры пригодности хроматографической системы (табл. 3). Валидацию разработанной методики проводили по следующим характеристикам: специфичность, линейность, предел количественного определения, правильность и прецизионность [14]. Показатели, установленные на основании проведенных валидационных исследований, позволяют охарактеризовать данную методику как специфичную, точную и достоверную.

Проведенный в соответствии с разработанной методикой анализ ЛП аллергенов свидетельствует о том, что во всех препаратах содержание остаточных органических растворителей

Таблица 2. Аллергенная активность СОП ААА

Table 2. Allergenic activity of in-house reference standards for allergenic activity of allergens

Наименование СОП <i>In-house RS name</i>	Специфическая (аллергенная) активность, ЕАА/мл <i>Allergenic activity, AAU/mL</i>	ДИ (95%) <i>CI (95%)</i>
Аллерген из пыльцы тимopheевки луговой (<i>Phleum pratense</i>) <i>Pollen allergen of timothy grass (Phleum pratense)</i>	138 700	±22 550
Аллерген из пыльцы ржи посевной (<i>Secale cereale</i>) <i>Pollen allergen of cultivated rye (Secale cereale)</i>	177 300	±31 300
Аллерген из пыльцы полыни горькой (<i>Artemisia absinthium</i>) <i>Pollen allergen of common wormwood (Artemisia absinthium)</i>	204 000	±37 390
Аллерген из пыльцы березы повислой (<i>Betula pendula</i>) <i>Pollen allergen of European white birch (Betula pendula)</i>	112 800	±25 670
Аллерген из пыльцы ежи сборной (<i>Dactylis glomerata</i>) <i>Pollen allergen of cocksfoot grass (Dactylis glomerata)</i>	235 700	±29 210
Аллерген из пыльцы орешника (лещины обыкновенной) (<i>Corylus avellana</i>) <i>Pollen allergen of common hazel (Corylus avellana)</i>	149 600	±16 030
Аллерген из пыльцы дуба черешчатого (<i>Quercus robur</i>) <i>Pollen allergen of pedunculate oak (Quercus robur)</i>	148 300	±17 510
Аллерген из пыльцы ольхи клейкой (<i>Alnus glutinosa</i>) <i>Pollen allergen of common alder (Alnus glutinosa)</i>	112 000	±16 890
Аллерген из пыльцы амброзии полыннолистной (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>) <i>Pollen allergen of common ragweed (Ambrosia artemisiifolia)</i>	88 700	±14 620
Аллерген из пыльцы овсяницы луговой (<i>Festuca pratensis</i>) <i>Pollen allergen of meadow fescue (Festuca pratensis)</i>	131 400	±22 078
Аллерген из пыльцы костера прямого (<i>Bromus erectus</i>) <i>Pollen allergen of upright brome (Bromus erectus)</i>	69 600	±12 546
Аллерген из пыльцы мятлика лугового (<i>Poa pratensis</i>) <i>Pollen allergen of meadow grass (Poa pratensis)</i>	101 300	±15 334
Аллерген из пыльцы подсолнечника однолетнего (<i>Helianthus annuus</i>) <i>Pollen allergen of common sunflower (Helianthus annuus)</i>	101 800	±18 146
Аллерген из пыльцы одуванчика лекарственного (<i>Taraxacum officinale</i>) <i>Pollen allergen of common dandelion (Taraxacum officinale)</i>	118 800	±19 444
Аллерген из пыльцы циклахены дурнишниковидной (<i>Cyclachaena xanthiifolia</i>) <i>Pollen allergen of giant sumpweed (Cyclachaena xanthiifolia)</i>	62 800	±10 723

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

Примечание. СОП ААА – стандартный образец предприятия аллергенной активности аллергена; ДИ – доверительный интервал.

Note. RS, reference standard; CI, confidence interval.

Таблица 3. Параметры пригодности хроматографической системы для диэтилового эфира и ацетона ($n=6$) (таблица заимствована авторами из источника [14])

Table 3. Parameters of suitability of the chromatographic system for diethyl ether and acetone ($n=6$) (cited by the authors from [14])

Органический растворитель, RSD <i>Organic solvent, RSD</i>	RT, мин <i>RT, min</i>	S, мЕОП×с <i>S, mAU×s</i>	A _s	Число теоретических тарелок <i>Theoretical plate number</i>
Диэтиловый эфир <i>Diethyl ether</i>	4,439	649	1,06	43 685
	4,440	645	1,06	42 547
	4,441	638	1,06	42 896
	4,439	635	1,05	43 245
	4,440	641	1,07	43 587
	4,441	643	1,06	42 987
RSD, %	0,02	0,80	—	—
Ацетон <i>Acetone</i>	5,123	750	1,07	51 948
	5,124	776	1,07	51 547
	5,122	771	1,08	51 014
	5,125	760	1,07	52 145
	5,122	759	1,08	52 578
	5,124	772	1,08	52 025
RSD, %	0,02	1,30	—	—

Примечание. RSD — максимальное относительное стандартное отклонение; RT — время удерживания; S — площадь пика; A_s — фактор асимметрии пиков.

Note. RSD, relative standard deviation; RT, retention time; S, peak area; AU, absorbance units; A_s, asymmetry factor.

отвечает требованиям ОФС.1.1.0008.15¹³ и составляет не более 0,5%: диэтиловый эфир — 0,0053–0,0524%, ацетон — 0,0029–0,0994%.

Закключение

В результате выполненных работ получены и впервые в практике предприятия аттестованы в единицах аллергенной активности (ЕАА) 15 первичных СОП аллергенов на выпускаемую номенклатуру. Переход от неспецифической характеристики аллергенной активности, выраженной в единицах белкового азота (PNU), к количественно определяемому специфическому показателю «Аллергенная активность» (в ЕАА) позволяет проводить последующую стандартизацию вторичных СОП аллергенной активности аллергенов по их специфической активности точным и воспроизводимым методом конкурентного иммуноферментного анализа. В результате обосновано предложение по исключению ранее применявшегося неселективного метода определения белкового азота. Разработка и валидация методики хроматографического определения остаточных органических растворителей позволили повысить качество и безопасность выпускаемой продукции.

Нормативная документация для аллергенов из пыльцы тимopheевки луговой, ржи посевной, полыни горькой, березы висячей, ежи сборной, орешника (лещины обыкновенной), дуба черешчатого, ольхи клейкой, амброзии полыннолистной, овсяницы луговой, костра прямого, мятлика лугового, подсолнечника однолетнего, одуванчика лекарственного, циклахены дурнишниковидной была приведена в соответствие с XIV изданием Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Получены регистрационные удостоверения на заявленные лекарственные препараты пылевых аллергенов с внесенным методом конкурентного иммуноферментного анализа, при помощи которого предлагается проводить контроль лекарственных препаратов по показателю «Аллергенная (специфическая) активность». Проведена аттестация вторичных СОП, используемых в рутинном контроле качества выпускаемых предприятием лекарственных препаратов пылевых аллергенов.

Представляется необходимым привлечение внимания научного сообщества к вопросу исключения показателя «Содержание белкового азота» в PNU как основной характеристики специфической активности лекарственных пре-

¹³ ОФС.1.1.0008.15 Остаточные органические растворители. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

паратов аллергенов и замены его на показатель «Аллергенная активность» в ЕАА, более точно

характеризующий степень выраженности специфической активности.

Литература/References

1. Невская ЛВ, Лавренчик ЕИ, Жданова МЮ, Фадейкина ОВ, Капитанова ВК. Международный опыт стандартизации препаратов аллергенов. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(4):222–9.
Nevskaya LV, Lavrenchik EI, Zhdanova MYu, Fadeyukina OV, Kapitanova VK. International practice of allergen products standardization. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(4):222–9 (In Russ.).
EDN: [ZXGLKT](https://doi.org/10.26907/2542-1247.2017.4.222-229)
2. Цымбаревич ИВ, Ефимова ИС, Калинин СП, Зубков АВ, Мазурина СА, Михайлова НА, Зубкова НВ. Характеристика кандидата в стандартные образцы аллергена из пыльцы тимотея луговой по белковому профилю и специфическим аллергенным компонентам. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(2):92–7.
Tsyymbarevich IV, Efimova IS, Kalinin SP, Zubkov AV, Mazurina SA, Mikhailova NA, Zubkova NV. Characterization of the candidate reference material of timothy pollen allergen extract in terms of protein profile and specific allergenic components. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(2):92–7 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-92-97>
3. Bastl K, Bastl M, Bergmann K-C, Berger M, Berger U. Translating the burden of pollen allergy into numbers using electronically generated symptom data from the patient's hayfever diary in Austria and Germany: 10-year observational study. *J Med Internet Res*. 2020;22(2):e16767.
<https://doi.org/10.2196/16767>
4. Kiguchi T, Yamamoto-Hanada K, Saito-Abe M, Sato M, Irahara M, Ogita H, et al. Pollen-food allergy syndrome and component sensitization in adolescents: A Japanese population-based study. *PLoS One*. 2021;16(4):e0249649.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249649>
5. Ta V, Scott DR, Chin WK, Wineinger NE, Kelso JM, White AA. Differential skin test reactivity to pollens in pollen food allergy syndrome versus allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc*. 2015;36(5):379–85.
<https://doi.org/10.2500/aap.2015.36.3862>
6. Таубэ АА, Буянова ТА, Саканян ЕИ. Минимизация рисков применения лекарственных препаратов на основе пыльцы на стадии заготовки сырья. *Фармация и фармакология*. 2022;10(2):154–63.
Taube AA, Buyanova TA, Sakanyan EI. Minimisation of risks associated with the use of pollen-based medicines, at the stage of pollen collection. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(2):154–63 (In Russ.).
<https://doi.org/10.19163/2307-9266-2022-10-2-154-163>
7. Yagami A, Ebisawa M. New findings, pathophysiology, and antigen analysis in pollen-food allergy syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2019;19(3):218–23.
<https://doi.org/10.1097/aci.0000000000000533>
8. Петрова СЮ, Бержец ВМ, Петрова НС, Хрулева ВА, Емельянов ОЮ, Хлгатын СВ, Коренева ЕА. Перспективы развития лечебных форм аллергенов. От абстрактных проблем к конкретным решениям. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2018;(1):40–7.
Petrova SYu, Berzhets VM, Petrova NS, Hrulyova VA, Emelyanova OYu, Hlgatyan SV, Koreneva EA. Future prospect of allergen therapeutic forms. From abstract problems towards specific solutions. *International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2018;(1):40–7 (In Russ.).
<https://doi.org/10.14427/jipai.2018.1.40>
9. Fortescue R, Kew KM, Tsun Leung MS. Sublingual immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;9(9):CD011293.
<https://doi.org/10.1002/14651858.cd011293.pub3>
10. Asero R, Mistrello G, Amato S. Detection of pan-allergens in commercial pollen extracts for allergen immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2016;117(2):180–5.
<https://doi.org/10.1016/j.anai.2016.05.010>
11. Poncet P, Sénéchal H, Charpin D. Update on pollen-food allergy syndrome. *Rev Clin Immunol*. 2020;16(6):561–78.
<https://doi.org/10.1080/1744666x.2020.1774366>
12. Zimmer J, Bridgewater J, Ferreira F, van Ree R, Rabin RL, Vieths S. The history, present and future of allergen standardization in the United States and Europe. *Front Immunol*. 2021;12:725831.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.725831>
13. Gjesing B, Jäger L, Marsh DG, Løwenstein H. The international collaborative study establishing the first international standard for timothy (*Phleum pratense*) grass pollen allergenic extract. *J Allergy Clin Immunol*. 1985;75(2):258–67.
[https://doi.org/10.1016/0091-6749\(85\)90055-7](https://doi.org/10.1016/0091-6749(85)90055-7)
14. Бубенчиков РА, Саканян ЕИ, Зубкова НВ, Добрынин ВП, Горяинов СВ, Хажжар Ф и др. Разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов методом ГЖХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):159–68.
Bubenichikov RA, Sakanyan EI, Zubkova NV, Dobrynin VP, Goriainov SV, Hajjar F, et al. Development and validation of a procedure for the quantitative determination of residual organic solvents in allergen preparations by GC. *Drug Development & Registration*. 2022;11(2):159–68 (In Russ.).
<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-159-168>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.И. Саканян** — организация и координирование этапов исследования, редактирование и переработка текста рукописи; **М.А. Ясная** — анализ и обобщение данных литературы, написание текста рукописи, работа с таблицами и графическим материалом; **В.Ф. Вуль** — координирование этапов исследования, сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; **Р.А. Бубенчиков** — обобщение и интерпретация результатов исследования, редактирование и переработка текста рукописи; **Н.В. Винокурова, Е.С. Юртаева** — анализ и обобщение данных литературы, редактирование и переработка текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Клинические исследования рассмотрены и одобрены на заседаниях Комитета по этике АНО «Научно-исследовательский институт общественного здоровья» (выписка из протокола № 1 от 17.08.2018, выписка из протокола № 1-25/05/18 от 25.05.2018, выписка из протокола № 2-25/05/18 от 25.05.2018). На проведение клинических исследований получены разрешения Минздрава России № 652 от 14.12.2017, № 674–680 от 21.12.2017, № 24–26 от 24.01.2018, № 70, 71 от 20.02.2018, № 73, 76, 77 от 21.02.2018, № 64 от 02.02.2022.

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

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.I. Sakanyan** organised and coordinated the study, edited and revised the manuscript. **M.A. Yasnaya** analysed and summarised literature data, drafted the manuscript, and prepared the tabular and graphical material. **V.F. Vul** coordinated the study; collected, analysed, and collated experimental data. **R.A. Bubenchikov** summarised and interpreted the study results, edited and revised the manuscript. **N.V. Vinokurova** and **E.S. Yurtaeva** analysed and summarised literature data, edited and revised the manuscript.

Ethics approval. Clinical trials were reviewed and approved at meetings of the Ethics Committee at the autonomous non-profit organisation National Research Institute of Public Health in 2017–2022 (Excerpts of Minutes No. 1 of 17.08.2018, No. 1-25/05/18 of 25.05.2018, and No. 2-25/05/18 of 25.05.2018). Clinical trials were approved by the Ministry of Health of the Russian Federation (Approvals No. 652 of 14.12.2017; Nos. 674–680 of 21.12.2017; Nos. 24–26 of 24.01.2018; Nos. 70 and 71 of 20.02.2018; Nos. 73, 76, and 77 of 21.02.2018; and No. 64 of 02.02.2022).

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

Об авторах / Authors

Саканян Елена Ивановна, д-р фарм. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1693-2422>

Ясная Мария Анатольевна, канд. хим. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4486-4834>

Вуль Всеволод Феликсович
v.f.vul@microgen.ru

Бубенчиков Роман Александрович, д-р фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0955-6892>

Винокурова Наталья Владимировна
n.v.vinokurova@microgen.ru

Юртаева Екатерина Сергеевна
e.s.yurtaeva@microgen.ru

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

Maria A. Yasnaya, Cand. Sci. (Chem.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4486-4834>

Vsevolod F. Vul
v.f.vul@microgen.ru

Roman A. Bubenchikov, Dr. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0955-6892>

Natalya V. Vinokurova
n.v.vinokurova@microgen.ru

Ekaterina S. Yurtaeva
e.s.yurtaeva@microgen.ru

Поступила 31.07.2023

После доработки 29.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 31 July 2023

Revised 29 August 2023

Accepted 13 September 2023



Изучение биофармацевтических свойств препарата поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме

А.М. Николаева✉, Н.А. Ковязина, Е.В. Функнер, А.Н. Красильникова, К.А. Лыско

Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским
иммунобиологическим препаратам «Микроген», филиал в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»,
ул. Братская, д. 177, г. Пермь, 614089, Российская Федерация

✉ Николаева Алевтина Максимовна; a.m.nikolaeva@perm.microgen.ru

Резюме

Актуальность. Рациональная фаготерапия — высокоэффективный способ борьбы с бактериальными инфекциями в условиях неуклонно растущей антибиотикорезистентности. Основной лекарственной формой препаратов бактериофагов является раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Однако при пероральном приеме жидких лекарственных форм фаговых препаратов происходит их значительная инактивация за счет кислой среды желудочного сока. С целью устранения негативного влияния кислой среды разработан лекарственный препарат поливалентного бактериофага в форме капсул — Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный.

Цель. Изучение специфической активности и биофармацевтических свойств лекарственного препарата поливалентного бактериофага в капсулированной форме.

Материалы и методы. Объект исследования — препарат поливалентного бактериофага в капсулированной форме; препарат сравнения — препарат поливалентного бактериофага в форме раствора. Специфическую активность изучали с использованием метода Аппельмана, количество фаговых частиц — методом Грация. Исследование кислотонейтрализующей способности проводили путем выдерживания препарата в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты с последующим определением специфической активности по методу Аппельмана. Антифаговый иммунный ответ на антигены бактериофага изучали на кроликах породы Шиншилла, уровень иммунного ответа детектировали с помощью разработанной иммуноферментной тест-системы. Исследование фармакокинетических параметров проводили на беспородных белых мышах при пероральном введении препарата.

Результаты. Выявлен высокий уровень литической активности исследуемого препарата, который по величине отрицательной степени десятичного разведения составлял 10^{-6} в отношении исследуемых микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. Показатель степени всасывания после перорального введения мышам препарата поливалентного бактериофага в капсулированной форме был в 3,1–3,7 раза выше в сравнении с препаратом поливалентного бактериофага в форме раствора. Многократное пероральное введение исследуемого препарата кроликам в терапевтических дозах не стимулировало образования антифаговых антител. Исследование стабильности препарата показало сохранение высокого уровня литической активности в течение 18 мес.

Выводы. Препарат поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме обладает высоким антибактериальным действием в отношении исследуемых микроорганизмов, характеризуется высокой степенью всасывания и длительным сохранением литической активности, а также не вызывает выработку антифаговых антител при пероральном применении, что свидетельствует об эффективности и безопасности разработанного препарата.

Ключевые слова: поливалентные бактериофаги; фаготерапия; капсулированный препарат; лекарственная форма; биофармацевтические свойства; антифаговые антитела; фармакокинетика; литическая активность; антибиотикорезистентность

Для цитирования: Николаева А.М., Ковязина Н.А., Функнер Е.В., Красильникова А.Н., Лыско К.А. Изучение биофармацевтических свойств препарата поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23 (3-1):379–388. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-379-388>

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

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

Biopharmaceutical properties of polyvalent bacteriophage capsules

Alevtina M. Nikolaeva ✉, Natalya A. Kovyazina, Elena V. Funkner,
Anna N. Krasilnikova, Kseniya A. Lysko

Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, Branch in Perm
“Perm SIC “Biomed”, 177 Bratskaya St., Perm 614089, Russian Federation

✉ Alevtina M. Nikolaeva; a.m.nikolaeva@perm.microgen.ru

Abstract

Scientific relevance. Rational phage therapy is a highly effective way to combat bacterial infections, especially in conditions of steadily increasing antibiotic resistance. Most bacteriophage preparations are formulated as oral and topical solutions. However, oral administration of liquid phage preparations results in significant inactivation in the stomach. To shield active ingredients from the acidic environment, Sextaphag® Pyobacteriophage, polyvalent, has been formulated into capsules.

Aim. This study evaluated the polyvalent bacteriophage preparation in capsules in terms of its potency and biopharmaceutical properties.

Materials and methods. The study compared the polyvalent bacteriophage preparation formulated as capsules with the polyvalent bacteriophage preparation formulated as a solution. The potency was evaluated by the Appelmans method, and phage particles were quantified by the Gratia method. To evaluate the acid-neutralising capacity, the authors placed test samples of the bacteriophage preparation in 0.1 M hydrochloric acid and analysed their potency by the Appelmans method. Chinchilla rabbits were used to analyse anti-phage immune responses, and their antibody levels were measured using an enzyme immunoassay test system developed by the authors. The pharmacokinetic parameters were studied in outbred white mice after oral dosing.

Results. The polyvalent bacteriophage preparation exhibited high lytic activity towards *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pneumoniae*, which accounted for a dilution factor of 10^{-6} . Following oral administration of the polyvalent bacteriophage preparation in capsules to mice, the level of absorption was 3.1–3.7 times higher than that observed with the solution. Repeated oral administration of therapeutic doses did not induce anti-phage antibodies in rabbits. The stability study showed that the polyvalent bacteriophage preparation retained high lytic activity for 18 months.

Conclusions. According to the study results, the polyvalent bacteriophage preparation in capsules exerts significant antibacterial activity against the studied microorganisms, has a high level of absorption, retains its lytic activity for a long time, and does not induce anti-phage antibodies after oral dosing, which confirms its safety and efficacy.

Key words: polyvalent bacteriophages; phage therapy; capsules; dosage form; biopharmaceutical properties; anti-phage antibodies; pharmacokinetics; lytic activity; antibiotic resistance

For citation: Nikolaeva A.M., Kovyazina N.A., Funkner E.V., Krasilnikova A.N., Lysko K.A. Biopharmaceutical properties of polyvalent bacteriophage capsules. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3–1):379–388. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-379-388>

Funding. The study was performed without external funding.

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

Введение

В последние десятилетия рост антибиотикорезистентности является одной из наиболее актуальных проблем в области общественного здравоохранения во всем мире, что требует особого внимания со стороны медицинского сообщества [1]. В условиях неуклонно растущей резистентности микроорганизмов к антибиотикам рациональная фаготерапия может стать одним из высокоэффективных способов борьбы с бактериальными инфекциями [2]. Препараты на основе бактериофагов характеризуются строгой специфичностью, отсутствием токсического и аллергического эффектов, не имеют противопоказаний к применению и могут использоваться для профилактики и лечения бактериальных инфекций у беременных, кормящих женщин и детей разного возраста. В настоящее время основной лекарственной формой выпуска препаратов бактериофагов является раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Однако при пероральном приеме жидких лекарственных форм фаговых препаратов происходит их значительная инактивация под воздействием кислой среды желудочного сока [3]. Существующая проблема недостаточной стабильности характеристик препаратов бактериофагов и снижение их титра обуславливают необходимость учитывать кислотно-щелочные условия, а также влияние иных факторов в желудочно-кишечном тракте при разработке состава пероральных форм препаратов бактериофагов [4]. С целью устранения указанных недостатков на предприятии АО «НПО «Микроген» (филиал в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед») разработан лекарственный препарат Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный в форме капсул, обеспечивающих сохранение литической активности бактериофага [5].

Цель работы — изучение специфической активности и биофармацевтических свойств лекарственного препарата поливалентного бактериофага в капсулированной форме.

Материалы и методы

Материалы

Объектом исследования являлся концентрат фильтратов фаголизатов бактерий (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus* (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, энтеропатогенных *Escherichia coli*), лиофилизированный с добавлением компонентов защитной среды и вспомогательных веществ, заключенный в желатиновые капсулы по 0,22 г (одна доза), — Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный в форме капсул (АО «НПО «Микроген», Россия). В качестве вспомогательных и защитных компонентов в препарате использовали: метилцеллюлозу (матрицеобразующий компонент), лактозу (криопротектор), сорбитол (корригент вкуса и запаха, влагоудерживающий компонент), кальция карбонат (обеспечение защиты бактериофагов при сушке), натрия альгинат (обеспечение кислотоустойчивости фармацевтической композиции), пектин (дизинтегрант), магния стеарат (антифрикционное вещество).

В качестве препарата сравнения использовали Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный в виде раствора для приема внутрь, местного и наружного применения (АО «НПО «Микроген», Россия). В качестве абиотического контроля применяли питательные среды, используемые в эксперименте, в том числе с добавлением вспомогательных и защитных компонентов фармацевтической композиции.

Методы

Специфическую активность бактериофагов оценивали по методу Аппельмана, определение фаговых частиц — по методу Грация в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV) согласно ОФС.1.7.1.0002.15¹. Для проведения исследования капсулу предварительно растворяли в 20 мл стерильного бульона, взятого для титрования, при температуре 37±1 °С. Для контроля использовали 120 штаммов ми-

¹ ОФС.1.7.1.0002.15 Бактериофаги. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

кроорганизмов из производственной коллекции (АО «НПО «Микроген», «Пермское НПО «Биомед», Россия), в том числе: *Staphylococcus aureus* – 20, *Streptococcus pneumoniae* – 20, *P. mirabilis* – 10, *P. vulgaris* – 10, *K. pneumoniae* – 20, *P. aeruginosa* – 20, *E. coli* – 20. Литическую активность по методу Аппельмана оценивали визуально по величине отрицательной степени десятичного разведения от 10^{-2} до 10^{-6} , при которой происходил полный лизис бактериальной культуры в жидкой питательной среде (бульон Хоттингера). С помощью метода Грация определяли количество активных бляшкообразующих фаговых единиц (БОЕ) на плотной питательной агаризованной среде (1,5% мясopептонный агар).

Антифаговый иммунный ответ на антигены бактериофага изучали на кроликах породы Шиншилла (АО «НПО «Микроген», «Питомник лабораторных животных», Россия). Использовались животные обоего пола с начальной массой 2000 ± 500 г (28 особей). Вводимое количество препарата соответствовало дозе, эквивалентной 10 терапевтическим дозам (ТД) для человека в перерасчете на массу тела животного (1 ТД препарата поливалентного бактериофага в капсулированной форме составляла 6,28 мг, жидкого препарата в форме раствора – 0,58 мл на кролика весом 2000 г). Животным 1 группы (8 кроликов) вводили перорально препарат поливалентного бактериофага в форме раствора; 2 группы (8 кроликов) – исследуемый препарат поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме (содержимое капсулы в виде суспензии). Животным 3 группы, контроль (4 кролика) вводили перорально стерильную воду в эквивалентном объеме. Препараты вводили на протяжении трех курсов (1 курс – 10 сут) с интервалами в 43–44 сут. У кроликов этих групп проводили отбор крови после окончания каждого курса перорального введения через 7, 14, 21, 28, 35 и 42 сут. Животным 4 группы (8 кроликов) вводили подкожно Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный в виде раствора ежедневно в течение 3 сут на протяжении 3 недель с интервалом между введением препарата 3–4 сут. В качестве адъювантов для данной группы применяли гель гидроксида алюминия. Забор крови

у животных 4 группы проводили через 8–12 сут после завершения иммунизации.

Уровень антифагового иммунного ответа детектировали с помощью иммуноферментного сэндвич-метода² с использованием разработанной авторами тест-системы [6] по наличию титра специфических IgG в диапазоне от 1/16 до 1/51200. Тест-система основана на взаимодействии фаговых антигенов, иммобилизованных на полистироловом планшете (Greiner Bio-One, Германия) с антителами к бактериофагам [7]. После стадии фиксации специфически реагирующих антител (к соответствующему монофагу) в течение 24 ч непрореагировавшие компоненты удаляли из реакционной системы путем трех последовательных промывок белково-солевым раствором на основе фосфатно-солевого буфера с Твин-20, pH $7,2 \pm 0,2$; образовавшийся комплекс антиген-антитело выявляли через 2,5 ч после термостатирования при 37 °C с помощью конъюгата антител против IgG кролика, меченного пероксидазой (a/Rabbit IgG (H+L) StrongZyme HRP Conjugate, SDT, Германия), разведенного в 70000 раз, с регистрацией по изменению окраски хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ООО «Хема», Россия). Реакцию останавливали с помощью стоп-реagenta – 5% раствора серной кислоты («Сигма-Тек», Россия). Результаты регистрировали на спектрофотометре PR 2100 (Sanofi Diagnostics Pasteur, Франция) при двух длинах волн: 450/620 нм. Уровень антифаговых антител выражали в условных единицах (УЕ, величина, обратная разведению сыворотки).

Определение показателя «Распадаемость капсул» проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV ОФС.1.4.2.0013.15³ и Фармакопеи Евразийского экономического союза ОФС 2.1.9.1⁴. Согласно требованиям ГФ РФ XIV ОФС.1.4.1.0005.18⁵ распадаемость капсул в воде очищенной должна составлять не более 30 мин.

Стабильность препарата поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме оценивали по показателю «Специфическая активность» методом Аппельмана через каждые 6 мес. на протяжении регламентированного срока годности. Препарат хранили в полимерном герметичном флаконе с завинчи-

² ОФС.1.7.2.0033.15 Метод иммуноферментного анализа. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

³ ОФС.1.4.2.0013.15 Распадаемость таблеток и капсул. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ ОФС.2.1.9.1 Распадаемость таблеток и капсул (испытание А) (201090001-2019). Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии № 100 от 11.08.2020 «О Фармакопее Евразийского экономического союза».

⁵ ОФС.1.4.1.0005.18 Капсулы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

вающейся крышкой с силикагелевой вставкой при исследуемом температурном режиме в течение 18 мес.

Определение кислотонейтрализующей способности бактериофагов в составе капсул определяли путем выдерживания препарата в течение 1 ч в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты согласно требованиями ГФ РФ XIV ОФС.1.2.3.0016.15⁶ с последующим определением специфической активности по методу Апелльмана.

Фармакокинетические параметры изучали на беспородных белых мышах (питомник животных филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) обоего пола с начальной массой 20,0±2,0 г. Исследования проводили после однократного перорального введения исследуемого препарата и препарата сравнения в количестве, эквивалентном 10 дозам для человека (в перерасчете на массу тела животного 1 ТД препарата поливалентного бактериофага в капсулированной форме составляла 0,0628 мг, препарата в форме раствора — 0,0058 мл на массу тела мыши весом 20 г). Образцы мочи животных отбирали до перорального введения препаратов и через каждые 2 ч в течение 8 ч. Биоматериал, собранный от 10 мышей, разводили питательным бульоном Хоттингера, инкубировали 8–20 ч и обрабатывали хлороформом (0,25 мл хлороформа добавляли к 5 мл разведенной пробы) в течение 1 ч при комнатной температуре. При подготовке образцов крови мышей (объем пробы 2 мл) проводили отделение сыворотки. В образцах мочи и крови анализировали содержание фаговых частиц методом Грация по количеству БОЕ в 1 мл биологического материала согласно обозначенным временным промежуткам. Относительную степень всасывания (*f*) рассчитывали по формуле (1):

$$f = \frac{AUC_{0-8} \text{ препарата поливалентного бактериофага в форме капсул}}{AUC_{0-8} \text{ препарата поливалентного бактериофага в форме раствора}}, \quad (1)$$

где AUC_{0-8} — площадь под фармакокинетической кривой начиная с нулевого значения времени (до перорального введения препарата) и до вре-

мени полного выведения фага из организма животного (через 8 ч после введения препарата). Расчет показателя AUC_{0-8} производился по методу обычных трапеций⁷.

Исследования на животных были одобрены локальным Комитетом инспекторов по контролю качества доклинических исследований Филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» (№ 2015/3 от 28.10.2015) и проведены в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, использующихся для научных целей⁸.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов описательной статистики для расчета средних величин⁹. В работе использовали пакеты статистических программ Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования специфической активности показали, что исследуемый препарат поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме обладает высоким антибактериальным действием в отношении бактерий *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* (табл. 1).

Важными показателями качества лекарственных препаратов бактериофагов являются распадаемость капсул и устойчивость бактериофагов в кислой среде. В результате проведения теста по определению показателя качества «Распадаемость капсул» исследуемого препарата в воде очищенной установлено значение 16,8±1,3 мин (норма не более 30 мин). Изучение стабильности в кислой среде показало, что кислотоустойчивость препарата поливалентного бактериофага в форме капсул выше, чем у препарата в форме раствора. Показатель литической активности препарата поливалентного бактериофага в капсулированной форме сохранялся на исходном уровне после выдерживания в кислой среде в течение 1 ч, в отличие от препарата в жидкой форме в виде раствора (табл. 2).

Исследование показателей фармакокинетики выявило, что при пероральном введении препаратов поливалентного бактериофага происходит

⁶ ОФС.1.2.3.0016.15 Определение кислотонейтрализующей способности. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁷ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М: Гриф и К; 2013.

⁸ 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>

⁹ ОФС.1.1.0014.15 Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 1. Показатели активности препарата поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме
Table 1. Lytic activity values of the polyvalent bacteriophage preparation in capsules

Микроорганизм <i>Microorganism</i>	Показатель активности по методу <i>Lytic activity values by method</i>	
	метод Аппельмана* <i>Appelmans method *</i>	метод Грация, БОЕ/мл <i>Gratia method, PFU/mL</i>
<i>E. coli</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$6,1 \times 10^4 - 8,4 \times 10^5$
<i>P. aeruginosa</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$1,2 \times 10^4 - 5,1 \times 10^5$
<i>K. pneumoniae</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$1,1 \times 10^5 - 3,5 \times 10^5$
<i>S. aureus</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$2,1 \times 10^4 - 3,8 \times 10^5$
<i>Proteus (P. mirabilis, P. vulgaris)</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$5,3 \times 10^4 - 7,0 \times 10^5$
<i>S. pneumoniae</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$1,8 \times 10^5 - 4,5 \times 10^5$

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

Примечание. БОЕ — бляшкообразующие единицы; * — оценка литической активности по методу Аппельмана по значению отрицательной степени десятичного разведения.

Note. PFU, plaque-forming units; *, lytic activity assessment by the Appelmans method using dilution factors.

Таблица 2. Изучение кислотоустойчивости препарата поливалентного бактериофага в капсулированной и жидкой лекарственных формах по показателю специфической активности
Table 2. Acid tolerance of the polyvalent bacteriophage preparation in capsule and solution forms in terms of potency

Микроорганизм <i>Microorganism</i>	Специфическая активность* <i>Potency*</i>			
	Капсулированная лекарственная форма <i>Capsules</i>		Жидкая лекарственная форма (раствор) <i>Liquid dosage form (solution)</i>	
	Исходная (до воздействия кислой среды) <i>Baseline (before acidic treatment)</i>	После воздействия кислой среды <i>After acidic treatment</i>	Исходная (до воздействия кислой среды) <i>Baseline (before acidic treatment)</i>	После воздействия кислой среды <i>After acidic treatment</i>
<i>E. coli</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-4,17 \pm 0,37}$	$10^{-5,27 \pm 0,49}$	$10^{-1,33 \pm 0,47}$
<i>P. aeruginosa</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-4,50 \pm 0,50}$	$10^{-5,61 \pm 0,45}$	$10^{-1,17 \pm 0,69}$
<i>K. pneumoniae</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-5,00 \pm 0,00}$	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-2,17 \pm 0,69}$
<i>S. aureus</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-4,00 \pm 0,58}$	$10^{-4,93 \pm 0,49}$	$10^{-0,83 \pm 0,69}$
<i>Proteus (P. mirabilis, P. vulgaris)</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-4,37 \pm 0,69}$	$10^{-5,41 \pm 0,45}$	$10^{-0,50 \pm 0,50}$
<i>S. pneumoniae</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-4,17 \pm 0,69}$	$10^{-5,00 \pm 0,00}$	$10^{-1,17 \pm 0,69}$
Среднее значение <i>Mean</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-4,37 \pm 0,33}$	$10^{-5,34 \pm 0,21}$	$10^{-1,20 \pm 0,51}$

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

Примечание. * — оценка литической активности по методу Аппельмана по значению отрицательной степени десятичного разведения.

Note. *, lytic activity assessment by the Appelmans method using dilution factors.

Таблица 3. Фармакокинетические параметры препарата поливалентного бактериофага в капсулированной и жидкой лекарственных формах при однократном пероральном введении мышам

Table 3. Pharmacokinetic parameters of the polyvalent bacteriophage preparation in capsule and solution forms in mice after a single oral dose

Лекарственная форма препарата <i>Dosage form</i>	C_{max} , БОЕ/мл $\times 10^1$ C_{max} , PFU/mL $\times 10^1$	T_{max} , ч T_{max} , h	T_0 , ч T_0 , h	AUC_{0-8}	f
Анализируемый биоматериал — сыворотка крови <i>Biological fluid for analysis: serum</i>					
Капсулированная лекарственная форма <i>Capsules</i>	4,0	2	8	188,50	3,1
Жидкая лекарственная форма (раствор) <i>Liquid dosage form (solution)</i>	2,2	1	4	61,60	
Анализируемый биоматериал — моча <i>Biological fluid for analysis: urine</i>					
Капсулированная лекарственная форма <i>Capsules</i>	6,1	4	8	247,75	3,7
Жидкая лекарственная форма (раствор) <i>Liquid dosage form (solution)</i>	2,0	4	8	66,25	

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

Примечание. $C_{\max}$ – максимальная концентрация бактериофагов в биоматериале животного; БОЕ – количество бляшкообразующих единиц в 1 мл биоматериала животного (сыворотка крови, моча); $T_{\max}$ – время достижения максимальной концентрации бактериофагов в биоматериале животного; T_0 – время полного выведения фага из организма животного; AUC_{0-8} – площадь под фармакокинетической кривой начиная с нулевого значения времени до времени отбора образца биоматериала через 8 ч после введения препарата; f – степень всасывания.

Note. $C_{\max}$, maximum phage concentration in the animal biological fluid sample; PFU, number of plaque-forming units in 1 mL of the animal biological fluid (serum, urine); $T_{\max}$, time to maximum bacteriophage concentration in the sample; T_0 , time to complete bacteriophage elimination; AUC_{0-8} , area under the pharmacokinetic curve from baseline to 8 h after administration; f , degree of absorption.

всасывание фагов в кровь, их биораспределение в организме и выведение с мочой. По результатам анализа биообразцов (образцы сыворотки крови и мочи) после однократного перорального введения препаратов мышам установлено, что степень всасывания препарата поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме в 3,1–3,7 раза выше по сравнению с препаратом поливалентного бактериофага в жидкой форме (табл. 3).

В ходе исследования стабильности препарата поливалентного бактериофага в форме капсул проводили изучение специфической активности препарата и определяли его литическую активность на протяжении регламентированного срока годности. Установлено, что исследуемый препарат сохраняет высокий уровень показателя специфической активности при хранении при температуре от 2 до 8 °C в течение 18 мес. (табл. 4).

В научной литературе появились данные исследований, свидетельствующие об образовании специфических противофаговых антител в результате многократного перорального применения препаратов бактериофагов, вследствие чего происходит снижение эффективности фаготерапии [8]. В качестве одного из со-

временных методов выявления специфических антител применяют иммуноферментный анализ, однако в настоящее время коммерческие тест-системы, предназначенные для определения антифагового ответа, отсутствуют. В связи с этим авторами статьи были проведены исследования по разработке тест-системы с целью определения иммунного ответа на введение фаговых препаратов.

Анализ результатов проведенного исследования по изучению уровня антифаговых антител после многократного введения препаратов кроликам показал, что в образцах сыворотки крови животных, получавших препарат поливалентного бактериофага в капсулированной и жидкой лекарственных формах, антител к бактериофагам не обнаружено, в то время как в сыворотке кроликов после цикловой иммунизации путем подкожного введения препарата поливалентного бактериофага (в жидкой лекарственной форме) с применением адъюванта уровень антител к отдельным бактериофагам составил 25600–51200 УЕ (к бактериофагу против *Staphylococcus* spp. – 25600, против *Pseudomonas aeruginosa* – 51200, против *Klebsiella* spp. – 3200, к бактериофагам против бактерий *Escherichia coli*, *Proteus* spp. и *Streptococcus* spp. – 1600).

Таблица 4. Результаты исследований стабильности препарата поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме по показателю специфической активности**Table 4.** Stability testing results for polyvalent bacteriophage capsules in terms of potency

Срок хранения <i>Storage period</i>	Специфическая активность, %* <i>Potency, %*</i>		
	Температура хранения, °C <i>Storage temperature, °C</i>		
	35–37 °C	23–25 °C	2–8 °C
0 сут <i>0 days</i>	100	100	100
1 нед. <i>1 week</i>	98	100	100
2 нед. <i>2 weeks</i>	95	100	100
1 мес. <i>1 month</i>	88	98	100
3 мес. <i>3 months</i>	84	92	99
6 мес. <i>6 months</i>	78	87	90
9 мес. <i>9 months</i>	41	50	73
12 мес. <i>12 months</i>	17	26	65
18 мес. <i>18 months</i>	0	24	64

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

Примечание. * — показатель специфической активности вычисляли в процентах от исходного уровня значения литической активности (10^{-6} – 100%).

Note. *, calculated as a percentage of the initial lytic activity (10^{-6} was considered 100%).

Заключение

Продemonстрирован высокий уровень литической активности поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме, который по величине отрицательной степени десятичного разведения составлял 10^{-6} в отношении исследуемых микроорганизмов (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*). Показана более высокая кислотоустойчивость исследуемого препарата относительно препарата сравнения. Показатель степени всасывания препарата поливалентного бактериофага в форме капсул был в 3,1–3,7 раза выше в сравнении с препаратом поливалентного бактериофага в форме раствора. Многократ-

ное пероральное введение исследуемого препарата в терапевтических дозах не стимулировало образования антифаговых антител. Показано сохранение стабильности препарата в течение 18 мес.

Таким образом, проведенные биофармацевтические исследования показали, что разработанный препарат поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме обладает высокой специфической активностью, кислотоустойчивостью, стабильностью при хранении, а также не вызывает выработку антифаговых антител, что соответствует требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. и Фармакопеи Евразийского экономического союза.

Литература/References

- Кузьменков АЮ, Виноградова АГ. Мониторинг антибиотикорезистентности: обзор информационных ресурсов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020;19(2):163–70.

- Kuzmenkov AYU, Vinogradova AG. Antimicrobial resistance monitoring: a review of information resources. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020;19(2):163–70 (In Russ.).

- <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-163-170>
2. Ефименко ТА, Терехова ЛП, Ефременкова ОВ. Современное состояние проблемы антибиотикорезистентности патогенных бактерий. Антибиотики и химиотерапия. 2019;64(5–6):64–8.
Efimenko TA, Terekhova LP, Efremenkova OV. Current state the problem of antibiotic resistance of pathogens. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2019;64(5–6):64–8 (In Russ.).
<https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-100033>
 3. Ковязина НА, Функнер ЕВ, Николаева АМ, Орлова ЕВ, Ефимова МГ, Шитова ОИ. Технологические аспекты разработки капсул с бактериофагами. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия, биология, фармация*. 2015;(1):132–6.
Kovyazina NA, Funkner EV, Nikolaeva AM, Orlova EV, Efimova MG, Shitova OI. Technological aspects of development of capsules with bacteriophages. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry, Biology, Pharmacy*. 2015;(1):132–6 (In Russ.).
EDN: [TTUGTB](#)
 4. Baqer AA, Fang K, Mohd-Assaad N, Adnan SNA, Md Nor NS. *In vitro* activity, stability and molecular characterization of eight potent bacteriophages infecting carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Viruses*. 2023;15(1):117.
<https://doi.org/10.3390/v15010117>
 5. Ковязина НА, Функнер ЕВ, Николаева АМ, Орлова ЕВ, Ефимова МГ, Шитова ОИ. Антибактериальная фармацевтическая композиция для перорального применения, содержащая бактериофаги. Патент Российской Федерации № 2660355; 2018.
Kovyazina NA, Funkner EV, Nikolaeva AM, Orlova EV, Efimova MG, Shitova OI. Antibacterial pharmaceutical composition for oral use containing bacteriophages. Patent of the Russian Federation No. 2660355; 2018 (In Russ.).
EDN: [YPANBC](#)
 6. Красильникова АН, Сперанская ВН, Ковязина НА, Селезнева НР. К вопросу об образовании антител к бактериофагам. В кн.: Николаева А.М., ред. *Перспективы развития производства и применения иммунобиологических препаратов в XXI веке*. Пермь; 2018. С. 185–9.
Krasilnikova AN, Speranskaya VN, Kovyazina NA, Selezneva NR. On the issue of the formation of antibodies to bacteriophages. In: Nikolaeva AM, ed. *Prospects for the development of production and use of immunobiologicals in the 21st century*. Perm; 2018. P. 185–9 (In Russ.).
EDN: [XVIFGH](#)
 7. Николаева АМ, Казьянин АВ, Вязникова ТВ, Борисова ВН, Буданов МВ, Яковлева ИМ, Мельников ВА. Тест-система для определения антител к HBs-антигену и блокатор в тест-системе. Патент Российской Федерации № 2206095; 2001.
Nikolaeva AM, Kaz'yanin AV, Vyaznikova TV, Borisova VN, Budanov MV, Yakovleva IM, Mel'nikov VA. Test system for detecting antibodies to HBs antigen and test system blocker. Patent of the Russian Federation No. 2206095; 2001 (In Russ.).
EDN: [SNYAPB](#)
 8. Алешкин АВ, Светоч ЭА, Воложанцев НВ, Киселева ИА, Рубальский ЕО, Ершова ОН, Новикова ЛИ. Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия Российской Федерации. *Бактериология*. 2016;(1):22–31.
Aleshkin AV, Svetoch EA, Volozhantsev NV, Kiseleva IA, Rubalsky EO, Ershova ON, Novikova LI. Innovative directions for using bacteriophages in the sphere of sanitary and epidemiological welfare of the Russian Federation. *Bacteriology*. 2016;(1):22–31 (In Russ.).
<https://doi.org/10.20953/2500-1027-2016-1-22-31>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.М. Николаева** – автор идеи, обоснование концепции исследования; обобщение и интерпретация результатов исследования; формулировка выводов; утверждение окончательного варианта рукописи; **Н.А. Ковязина** – проведение инструментальных исследований, сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; обобщение и интерпретация результатов исследования; **Е.В. Функнер** – обобщение и интерпретация результатов исследования; формулировка выводов; **А.Н. Красильникова** – проведение инструментальных исследований, сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных, редактирование и переработка текста рукописи; **К.А. Лыско** – редактирование и переработка текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Исследования на животных были одобрены локальным Комитетом инспекторов по контролю качества доклинических исследований Филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» (№ 2015/3 от 28.10.2015).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.M. Nikolaeva** devised the study idea, substantiated the study concept, generalised and interpreted the study results, formulated the conclusions, and approved the final version of the manuscript for publication. **N.A. Kovyazina** conducted tests; collected, analysed, and collated experimental data; generalised and interpreted the study results. **E.V. Funkner** generalised and interpreted the study results, formulated the conclusions. **A.N. Krasilnikova** conducted tests; collected, analysed, and collated experimental data; edited and revised the manuscript. **K.A. Lysko** edited and revised the manuscript.

Ethics approval. Animal studies were approved by the local Committee of Inspectors for Quality Control of Preclinical Studies at Biomed, the Perm branch of Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines (Approval No. 2015/3 of 28.10.2015).

Об авторах / Authors

Николаева Алевтина Максимовна, д-р биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>

a.m.nikolaeva@perm.microgen.ru

Ковязина Наталья Анатольевна, канд. фарм. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6660-1165>

natanat.pgfa@gmail.com

Функнер Елена Викторовна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9580-2166>

funknere@mail.com

Красильникова Анна Наилевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3507-5005>

annankrasilnikova@yandex.ru

Лыско Ксения Андреевна, канд. техн. наук

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-4276-4744>

k.a.lysko@microgen.ru

Поступила 22.06.2023

После доработки 17.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Alevtina M. Nikolaeva, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>

a.m.nikolaeva@perm.microgen.ru

Natalya A. Kovyazina, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6660-1165>

natanat.pgfa@gmail.com

Elena V. Funkner, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9580-2166>

funknere@mail.com

Anna N. Krasilnikova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3507-5005>

annankrasilnikova@yandex.ru

Kseniya A. Lysko, Cand. Sci. (Techn.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-4276-4744>

k.a.lysko@microgen.ru

Received 22 June 2023

Revised 17 August 2023

Accepted 13 September 2023

УДК 606:615.371

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-389-399>

Научная статья | Scientific article



Изучение вакцины против клещевого энцефалита

О.В. Стронин[✉], А.А. Епанчинцев, А.А. Колтунов

Научно-производственное объединение «Вирион», филиал Акционерного общества «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», ул. Ивановского, д. 8, Томск, 634050, Российская Федерация

✉ Стронин Олег Владимирович; o.v.stronin@microgen.ru

Резюме

Актуальность. Клещевой энцефалит — один из наиболее актуальных для здоровья населения России антропоозооноз, контроль над которым требует широкого охвата вакцинацией. Масштабная вакцинация невозможна без разработки новых вакцин, например с применением перевиваемой линии клеток Vero, обладающих улучшенным профилем безопасности и эффективности.

Цель. Расширенное изучение ключевых показателей качества новой вакцины «ВероКСЭН» против клещевого энцефалита, полученной с использованием перевиваемой линии клеток Vero.

Материалы и методы. В технологии создания вакцины реализованы современные подходы: накопление производственного штамма вируса клещевого энцефалита № 205 (дальневосточный субтип) в клетках перевиваемой линии Vero; использование для заключительной тонкой очистки вирусного антигена эксклюзионной хроматографии на полимерных сорбентах; введение дополнительных методов контроля. Вакцину «ВероКСЭН» получали способом, описанным в патенте на изобретение № 2678431. Контроль готового продукта проводили в соответствии с методиками, описанными в Государственной фармакопее Российской Федерации. Для лабораторного изучения вакцины и полупродуктов на мышах линии Balb/c были разработаны и внедрены оригинальные новые методы контроля, а также применялись: электрофорез в полиакриламидном геле, иммуноферментный анализ, иммуноблот с суммарными антителами против вируса клещевого энцефалита и моноклональными антителами против гликопротеина Е, метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, высокоскоростная жидкостная хроматография. При расширенном лабораторном исследовании протективной активности использовали тест-штаммы субтипов «Абсеттаров» (западный), «Софьин» (дальневосточный) и «Корзухин» (сибирский). Оценку инфекционной активности вируса клещевого энцефалита проводили при помощи фармакопейного метода титрования на беспородных мышах. Результаты исследований оценивали при помощи статистических методов анализа с вычислением среднего арифметического и среднеквадратичного отклонения.

Результаты. Изучены ключевые показатели качества новой вакцины против клещевого энцефалита «ВероКСЭН» и ее полупродуктов. Показано, что выбранный режим инаktivации снижает инфекционную активность вирусного сбора до недетектируемого уровня через 24 ч, при этом антигенная активность сохраняется на уровне около 100% от исходного значения. Этапы тонкой очистки, а также разработанные оригинальные методики и технологии позволили получить целновирионную фракцию с чистотой до 98,2% и удалить технологические примеси (ДНК клеток-продуцентов, бычий сывороточный альбумин, формальдегид, бактериальные эндотоксины) до уровней, соответствующих нормативным требованиям. Изучение стабильности вакцины на сроке хранения до 36 мес. подтвердило ее соответствие нормативным показателям.

Выводы. Новая вакцина обладает высокой специфической активностью в отношении вируса клещевого энцефалита для штаммов «Абсеттаров», «Софьин» и «Корзухин»: минимальная иммунизирующая доза (МИД₅₀) составила 0,007, 0,00125 и 0,00093 мл соответственно.

© О.В. Стронин, А.А. Епанчинцев, А.А. Колтунов, 2023

Ключевые слова: клещевой энцефалит; вакцина; Vero; ВероКСЭН; разработка вакцины; исследование

Для цитирования: Стронин О.В., Епанчинцев А.А., Колтунов А.А. Изучение вакцины против клещевого энцефалита. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):389–399. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-389-399>

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

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

Study of a tick-borne encephalitis vaccine

Oleg V. Stronin ✉, Anton A. Epanchintsev, Aleksandr A. Koltunov

*Virion, Branch of Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines,
8, Ivanovsky St., Tomsk 634050, Russian Federation*

✉ Oleg V. Stronin; o.v.stronin@microgen.ru

Abstract

Scientific relevance. Tick-borne encephalitis is one of the most significant anthroponozoonoses for public health in the Russian Federation. Wide vaccination coverage is required to control this zoonotic infection. However, large-scale immunisation is not feasible without developing novel vaccines with improved safety and efficacy profiles, such as vaccines based on the continuous Vero cell line.

Aim. This extended study aimed to investigate the key quality attributes of VeroKSEN, a new tick-borne encephalitis vaccine that was obtained using Vero cells.

Materials and methods. The authors implemented current approaches to vaccine development, including propagation of tick-borne encephalitis strain 205 (Far Eastern subtype) in Vero cells, fine purification of the viral antigen by size-exclusion chromatography on polymeric resins, and introduction of additional quality control methods. For VeroKSEN production, the authors used the method protected by utility patent No. 2678431. Quality control of the finished product was performed according to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. The laboratory study of the vaccine and its intermediates in Balb/c mice used novel control methods developed by the authors. Additional methods included polyacrylamide gel electrophoresis, enzyme immunoassay, immunoblotting with total antibodies to tick-borne encephalitis virus and monoclonal antibodies to glycoprotein E, reverse transcription–polymerase chain reaction, and high-performance liquid chromatography. The extended potency study used test strains of different subtypes, including Absettarov (Western), Sofjin (Far Eastern), and Korzukhin (Siberian). The authors studied the infectious activity of tick-borne encephalitis virus in outbred mice using the pharmacopoeial titration method. Statistical analysis of the study results involved calculating the arithmetic mean and the root-mean-square deviation.

Results. The authors studied the key quality attributes of VeroKSEN and its intermediates. Selected inactivation conditions reduced the infectious activity of the viral harvest to an undetectable level within 24 h, while its antigenic activity remained approximately 100% of the baseline. The fine purification stages and the methods and techniques developed by the authors provided a whole-virion fraction with a purity of up to 98.2% and removed process-related impurities (residual host-cell DNA, bovine serum albumin, formaldehyde, and bacterial endotoxins) to the levels required by national legislation. The stability study demonstrated that the vaccine met the requirements for up to 36 months.

Conclusions. The study showed the high potency of the new vaccine in terms of protection against the Western, Siberian, and Far Eastern subtypes of tick-borne encephalitis, with minimum immunising doses (MID_{50}) of 0.007, 0.00125, and 0.00093 mL, respectively.

Key words: tick-borne encephalitis; vaccine; Vero; VeroKSEN; vaccine development; study

For citation: Stronin O.V., Epanchintsev A.A., Koltunov A.A. Study of a tick-borne encephalitis vaccine. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3-1):389–399. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-389-399>

Funding. The work was performed without external funding.

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

Введение

Клещевой энцефалит (КЭ) — трансмиссивный природно-очаговый антропоозооз. Заражение человека возбудителем — вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) из семейства *Flaviviridae*, чаще всего происходит во время присасывания переносчика (клещи рода *Ixodes*). Эндемичные по КЭ регионы охватывают широкий пояс хвойных и смешанных лесов умеренной климатической зон Евразии от Западной Европы [1] до Дальнего Востока [2, 3]. В Российской Федерации КЭ — одно из значимых природно-очаговых заболеваний, так как именно на территории России циркулируют наиболее вирулентные штаммы вируса. Ежегодно сотни тысяч человек обращаются в медицинские учреждения по поводу присасывания клеща, тысячи — заболевают, а для сотен из них заболевание имеет тяжелые исходы — инвалидизацию или смерть [4].

Наиболее эффективный метод специфической профилактики КЭ — вакцинация, которая в десятки раз снижает вероятность заболевания и предотвращает развитие тяжелых форм и осложнений. В настоящее время в России зарегистрированы¹ четыре вакцины третьего поколения:

- ФСМЕ-ИММУН® (Вакцина клещевого энцефалита культуральная инактивированная очищенная сорбированная), Pfizer, Inc. (США) и Baxter, AG (Австрия);
- Энцевир® (Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная), АО «НПО «Микроген» (Россия);
- Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сухая (ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института»² полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН);
- Клещ-Э-Вак (Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная)³.

Производство перечисленных препаратов основано на сходных технологиях. Это сорбированные цельновирионные очищенные инактивированные вакцины. Культивирование ВКЭ ведется на клетках куриных эмбрионов. Различия в основном касаются производственного штамма, методов очистки и стабилизации препарата [5]. Полученные таким образом препараты имеют длительную историю успешного применения, однако к настоящему времени выявились недостатки использования первичных культур клеток:

- повышенный риск контаминации культуры латентными инфекционными агентами (микоплазмы и вирусы);
- повышенный риск контаминации иными примесями (антибиотики и прочие вещества, применяемые на птицефабриках);
- генетическая гетерогенность исходного биоматериала и, как следствие, низкая стандартизация репродукции вируса, нестабильность содержания балластных веществ в культуральной жидкости;
- нестабильное качество эмбрионов в зависимости от сезона, корма, периодов вакцинации, эпизоотий;
- повышенный риск развития аллергических реакций на примеси белков куриных эмбрионов;
- низкая технологичность производства, значительные трудности масштабирования технологии.

В этой связи становятся очевидными преимущества использования перевиваемых клеточных линий (взамен первично трипсионизированных клеток куриных эмбрионов). Их применение для производства вакцины КЭ соответствует общемировым тенденциям совершенствования технологий вакцин, направленных на повышение безопасности, эффективности и качества стандартизации. Линии перевиваемых клеток Vero и MDCK успешно используются для накопления вирусов при промышленном производстве вакцин

¹ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

² С 2021 г. ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

³ Производство ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН».

против полиомиелита [6], бешенства, японского энцефалита, герпеса, гриппа [5]. Ранее технологию производства вакцины клещевого энцефалита с использованием клеток Vero разработали в ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) и успешно провели I и II фазы клинических исследований [7]. В АО «НПО «Микроген» была разработана технология вакцины «ВероКСЭН» против клещевого энцефалита, на перевиваемых клетках Vero (в качестве субстрата накопления).

Цель работы — расширенное изучение ключевых показателей качества новой вакцины «ВероКСЭН» против клещевого энцефалита, полученной с использованием перевиваемой линии клеток Vero.

Материалы и методы

В качестве производственного использовали штамм ВКЭ № 205 (дальневосточный субтип), полученный из коллекции Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Минздрава СССР в 1978 г. и применяемый в течение длительного времени для производства зарегистрированной вакцины «ЭнцеВир». Главный и рабочий посевные материалы были аттестованы в соответствии с требованиями национального законодательства⁴.

Для культивирования производственного штамма использовали аттестованные главный и рабочий банки клеток Vero, происходящих из почек зеленой мартышки (*Cercopithecus*

aethiops). Линия получена из коллекции ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (далее — ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Накопление вирусного антигена осуществляли способом стационарного культивирования зараженного клеточного монослоя в клеточных фабриках (164327, Thermo Fisher Scientific) в среде MEM Eagle (ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) с добавлением фетальной сыворотки крупного рогатого скота (SV30160.031R, HyClone). Вирусный сбор инаktivировали регламентированным методом с помощью формалина⁵.

Метод глубинной фильтрации позволил провести грубую очистку вирусного антигена. Концентрирование раствора проводили при помощи ультрадиализации в тангенциальном потоке, используя систему SartoJet (Sartorius) и кассеты (Sartorius) с порогом отсечения 100 кДа; тонкую очистку вирусного антигена — при помощи эксклюзионной хроматографии⁶ [8].

Качество готового продукта контролировали в соответствии с методами Государственной фармакопеи⁷ Российской Федерации по таким показателям, как подлинность, время седиментационной устойчивости, проходимость через иглу, количественное содержание антигена вируса клещевого энцефалита, извлекаемый объем, стерильность, бактериальные эндотоксины, аномальная токсичность, pH, специфическая активность, полнота сорбции антигена, посторонние примеси: формальдегид и протамина сульфат, специфическая безопасность, общий белок, остаточная ДНК, бычий сывороточный альбумин (БСА), альбумин человека.

⁴ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.

ОФС.1.8.1.0002.15 Иммунобиологические препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

Приказ Министерства промышленности и торговли Российской Федерации от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики».

ФС.1.2.4.0015.18 Вирусная безопасность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

ФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

ФС.1.7.2.0006.15 Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁵ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.

⁶ Стручкова И.В., Кальясова Е.А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле. Электронное учебно-методическое пособие. Н. Новгород; 2012.

⁷ ФС.3.3.1.0031.15 Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инаktivированная жидкая сорбированная или сухая в комплекте с растворителем алюминия гидроксида. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

ОФС.1.7.2.0011.15 Требования к клеточным культурам — субстратам производства биологических лекарственных препаратов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

Для изучения специфической активности применяли стандартную методику⁸ на мышах линии Balb/c (масса 14–16 г, возрастная категория 30–35 дней, без различия пола). При расширенном лабораторном изучении кроме регламентированного тест-штамма «Абсеттаров» (западный субтип) использовали также штаммы «Софьин» (дальневосточный) и «Корзухин» (сибирский).

Инфекционную активность ВКЭ оценивали при помощи фармакопейного метода титрования на беспородных мышах⁹.

Процедуры и манипуляции с животными, проводимые в ходе доклинических исследований, рассмотрены и утверждены Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 2 от 29.12.2020).

Количественное содержание антигена ВКЭ и полноту сорбции определяли с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА), используя коммерческий набор D-1154 (АО «Вектор-Бест») и стандартный образец предприятия (СОП) вакцины КЭ с.070517, содержащий 12,18 мкг/мл инактивированного антигена ВКЭ: готовили серийные двукратные разведения испытуемых образцов (вакцины или ее полупродуктов) и СОП, вносили по 100 мкл в лунки планшета (в двух повторностях для каждого разведения), далее методику выполняли согласно инструкции производителя набора. Вычисление концентрации (антигенной активности) гликопротеина Е проводили методом параллельных линий¹⁰. Аттестовали СОП вакцины КЭ относительно стандарта гликопротеина Е ВКЭ по показателю «Содержание инактивированного антигена вируса КЭ» при помощи ИФА. Стандарт гликопротеина Е ВКЭ был изготовлен и аттестован в соответствии с собственной оригинальной методикой.

Определяли БСА методом ИФА с использованием набора BSA ELISA Kit (Cygnus Technologies) в соответствии с инструкцией производителя.

Остаточную ДНК клеток Vero выявляли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией согласно инструкции производителя набора resDNA SEQ Quantitative Vero DNA Kit (Applied Biosystems), с применением соб-

ственного СОПа с.011114, содержащего 5 мкг/мл ДНК клеток Vero.

Электрофорез в полиакриламидном геле выполняли в соответствии с описанным в литературе методом [9] в собственной модификации. Разделение проводили в электрофоретической камере Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) в прерывистом 4/12% геле в соответствии с инструкцией производителя оборудования. Перед использованием исследуемый образец дополнительно концентрировали (в 20 раз) в центрифужных концентраторах Amicon (Millipore), смешивали с равным объемом восстанавливающего буфера и подвергали тепловой денатурации при 95 °С в течение 5 мин. Стандарт молекулярных масс – Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific), 116–14,4 кДа. Краситель – бриллиантовый голубой Кумасси G-250 (Sigma-Aldrich). Визуализация гелей осуществлялась через систему документирования Gel Doc EZ System (Bio-Rad). Применяли камеру Mini Trans-Blot (Bio-Rad) при выполнении иммуноблота на стадии электропереноса белков из акриламидного геля на поливинилиденфторид-мембрану (PVDF) Immobilon-P (Millipore). Сайты неспецифической сорбции блокировали 3% раствором БСА (Sigma-Aldrich).

Затем проводили иммуноокрашивание мембраны с использованием моноклональных антител 14D5 к белку Е ВКЭ (БиоСан, Новосибирск) и конъюгата вторичных антител с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich); альтернативное иммуноокрашивание – при помощи конъюгата поликлональных антител к суммарным антигенам ВКЭ (АО «НПО «Микроген», Томск). Далее мембрану окрашивали 0,03% раствором 3,3'-диаминобензидина (Sigma-Aldrich) в присутствии 0,02% перекиси водорода в течение 20 мин.

Для анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) применяли хроматографическую систему 1290 Infinity (Agilent Technologies), оснащенную колонкой Protein-Pak SEC 300 SW (Waters).

Оценку результатов исследований проводили при помощи статистических методов анализа с вычислением среднего арифметического и среднеквадратичного отклонения¹¹.

⁸ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.

⁹ ФС.3.3.1.0031.15 Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая сорбированная или сухая в комплекте с растворителем алюминия гидроксида. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

¹⁰ 5.3. Statistical analysis of results of biological assays and tests. European Pharmacopoeia. 10th ed. V. I. Strasbourg: EDQM; 2019.

¹¹ ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

Результаты и обсуждение

Разработка новой вакцины КЭ, основанной на использовании перевиваемых клеток, с применением новой технологии культивирования и очистки начиналась с этапов формирования и аттестации главного и рабочего банков клеток Vero, а также главного и рабочего посевных материалов производственного штамма ВКЭ.

Применение перевиваемой линии субстратных клеток потребовало создания и внедрения новых методов, позволяющих контролировать полупродукты и готовый продукт в соответствии с актуальными нормативными требованиями, в частности методов определения остаточного содержания БСА и ДНК клеток Vero.

Разработанная вакцина представляет собой инактивированный формалином очищенный антиген ВКЭ, сорбированный на гидроокиси алюминия.

Согласно требованиям законодательства все стадии производства должны быть валидированы, а также показана эффективность¹² каждой из них. Одна из критических стадий производства инактивированных вирусных вакцин — инаktivация вирусного сбора. Несмотря на то что процесс инаktivации формальдегидом регламентирован и хорошо изучен, в данном исследовании был принципиально иной

состав среды. В связи с этим для подтверждения эффективности инаktivации в новой среде возникла необходимость более длительного изучения инфекционной и антигенной активности (рис. 1) — в течение 72 ч (на трех сериях вирусного сбора).

Через 24 ч после внесения инаktivирующего агента инфекционная активность трех серий вирусного сбора снижалась до недетектируемой, через 48 и 72 ч ее отсутствие подтверждалось. Антигенная активность каждой серии была нормирована относительно исходного уровня и выражена в процентах относительно исходной; после завершения процесса инаktivации эти значения практически не отличались. Таким образом было подтверждено, что выбранный режим инаktivации обеспечивает безопасность, сохраняя антигенную активность ВКЭ.

Ряд новых технологических решений позволил повысить воспроизводимость показателей качества препарата и снизить количество примесей. Использование современных полимерных сорбентов привело к повышению скорости процесса, эффективности очистки и стабильности результатов. Высокая степень очистки пика, соответствующего цельновирионной фракции, была продемонстрирована с помощью ВЭЖХ (рис. 2).

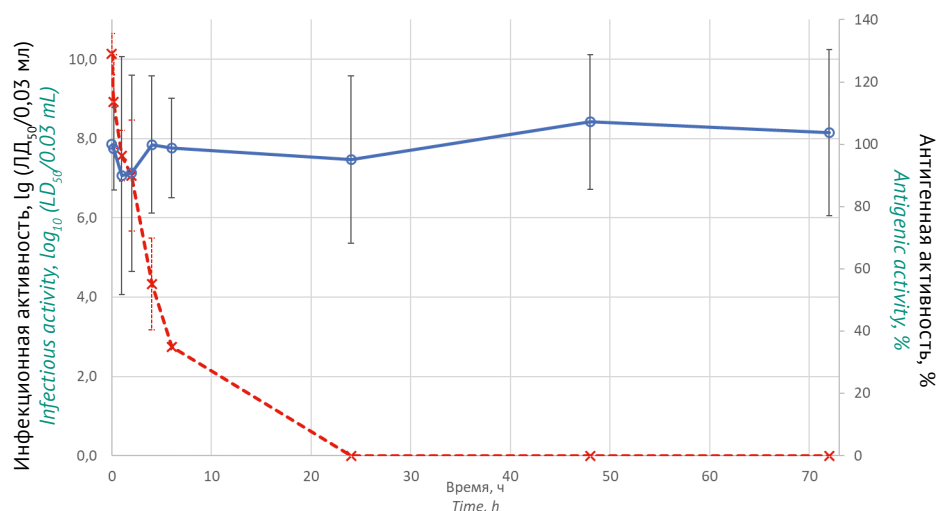


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Динамика инфекционной и антигенной активности в процессе инаktivации вирусного сбора по результатам трех серий. Антигенная активность нормирована относительно исходной, измеренной до добавления формалина. Интервалами указано стандартное отклонение. —х— — инфекционная активность (среднее арифметическое $\lg$ инфекционной активности); —о— — антигенная активность (среднее арифметическое $\lg$ антигенной активности).

Fig. 1. Time course of the infectious and antigenic activity of the virus harvest during inactivation, based on test results for three batches. Antigenic activity is normalised to the baseline values measured before adding formalin. The standard deviation is indicated by intervals. —х—, infectious activity (arithmetic means of $\lg$ values of infectious activity); —о—, antigenic activity (arithmetic means of $\lg$ values of antigenic activity).

¹² Решение Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

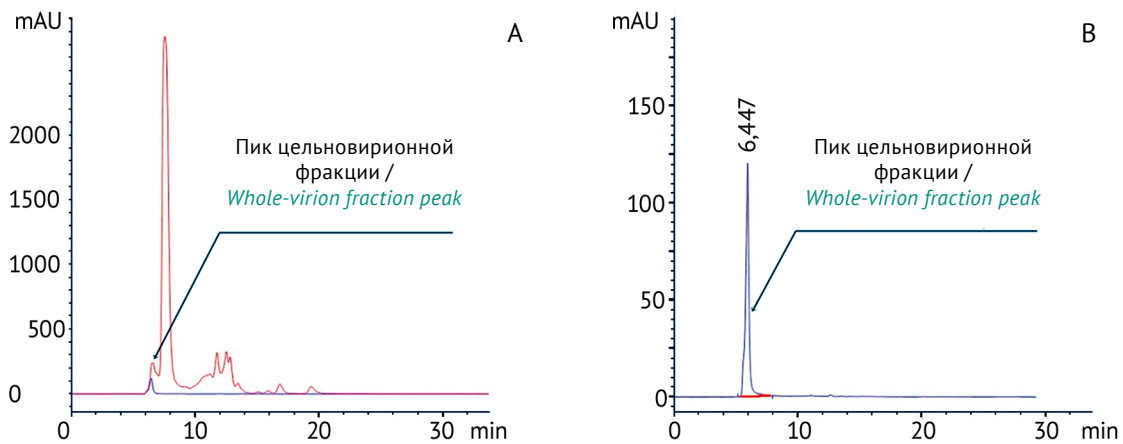


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Результаты контроля молекулярно-массового распределения полупродуктов вакцины «ВероКСЭН» методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. По оси абсцисс — время удерживания, мин; по оси ординат — оптическая плотность, mAU. А — хроматограмма очищенного концентрата: красным цветом — инактивированной вирусной взвеси; синим цветом — после хроматографической очистки. Б — хроматограмма очищенного концентрата с уменьшенным масштабом по оси ординат.

Fig. 2. Typical results of a molecular mass distribution test of VeroKSEN intermediates by high-performance liquid chromatography. The abscissa shows the retention time; the ordinate shows the absorbance. A, chromatogram of purified concentrate: inactivated virus suspension (red) and chromatographically purified concentrate (blue). B, chromatogram of chromatographically purified concentrate enlarged along the abscissa.

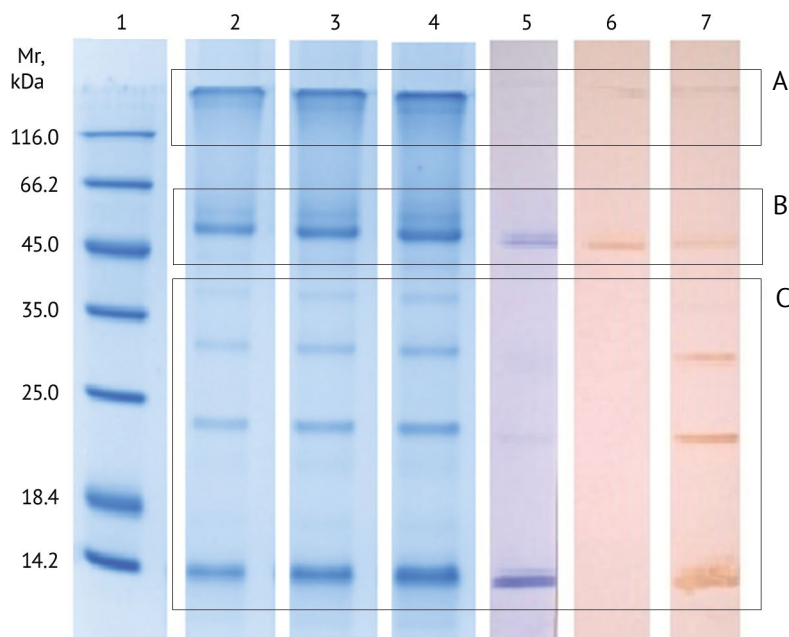


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Результаты электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблота очищенного концентрата вакцины «ВероКСЭН» (серия T08). 1 — стандарт молекулярных масс (Mr, кДа); 2–4 — электрофорез образца вакцины, нанесенной по 4, 6, 8 мкл на дорожку соответственно; 5 — контроль переноса белков на мембрану, окрашивание Кумасси G-250; 6 — иммуноблот вакцины, иммуноокрашивание моноклональными антителами к гликопротеину Е вируса клещевого энцефалита (ВКЭ); 7 — иммуноблот вакцины, иммуноокрашивание поликлональными антителами к суммарным антигенам ВКЭ. А, В, С — основные специфические вирусные белки.

Fig. 3. SDS-PAGE and immunoblotting results for the purified concentrate of VeroKSEN (batch T08). Lane 1 contains a molecular weight standard (Mr, kDa). Lanes 2–4 show electrophoresis of 4, 6, and 8 μ L samples of the vaccine, respectively. Lane 5 confirms protein transfer to the membrane (Coomassie G-250 staining). Lane 6 illustrates immunoblotting of the vaccine stained with monoclonal antibodies to tick-borne encephalitis virus (TBEV) glycoprotein E, and lane 7, with polyclonal antibodies to total TBEV antigens. A, B, and C stand for the main specific viral proteins.

Таблица 1. Ключевые показатели качества вакцины «ВероКСЭН» по результатам контроля восьми серий препарата в исследовании на мышах

Table 1. Critical quality attributes of the VeroKSEN vaccine and the results of testing eight batches of the vaccine in mice

Показатель качества (метод) <i>Quality attribute (method)</i>	Критерий приемлемости <i>Acceptance criterion</i>	Результат контроля, М±S <i>Control result, M±S</i>
Содержание антигена ВКЭ (ИФА) <i>TBEV antigen content (ELISA)</i>	2,0–6,0 мкг/мл <i>2.0–6.0 µg/mL</i>	4,3±0,9 мкг/мл <i>4.3±0.9 µg/mL</i>
Полнота сорбции антигена (ИФА) <i>Antigen adsorption (ELISA)</i>	80–100% <i>80–100%</i>	99,3±0,8% <i>99.3±0.8 %</i>
Специфическая активность, МИД ₅₀ (биологический) <i>Potency, MID₅₀ (bioassay)</i>	0,001–0,017 мл <i>0.001–0.017 mL</i>	0,005±0,003 мл <i>0.005±0.003 mL</i>
Специфическая безопасность (биологический) <i>Specific toxicity (bioassay)</i>	Не должна содержать живой ВКЭ <i>Must not contain live TBEV</i>	Не содержит живой ВКЭ <i>No live TBEV</i>
Содержание примесей: <i>Impurity content:</i>		
сахароза <i>sucrose</i>	40–60 мг/мл <i>40–60 mg/mL</i>	50,1±2,9 мг/мл <i>50.1±2.9 mg/mL</i>
алюминий <i>aluminium</i>	0,60–1,00 мг/мл <i>0.60–1.00 mg/mL</i>	0,76±0,05 мг/мл <i>0.76±0.05 mg/mL</i>
формальдегид (колориметрический) <i>free formaldehyde (colourimetry)</i>	≤20 мкг/мл <i>≤20 µg/mL</i>	<20 мкг/мл <i><20 µg/mL</i>
бычий сывороточный альбумин (ИФА) <i>residual bovine serum albumin (ELISA)</i>	≤50 нг в 1 дозе вакцины <i>≤50 ng/dose</i>	4,6±0,77 нг в 1 дозе вакцины <i>4.6±0.77 ng/dose</i>
ДНК субстратных клеток (ПЦР) <i>residual host-cell DNA (PCR)</i>	≤10 нг в 1 дозе вакцины <i>≤10 ng/dose</i>	5,85±1,7 нг в 1 дозе вакцины <i>5.85±1.7 ng/dose</i>
бактериальные эндотоксины (гель-тромб тест, метод А) ^а <i>bacterial endotoxins (gel-clot test, method A)^a</i>	≤25 ЕЭ/мл <i>≤25 EU/mL</i>	<25 ЕЭ/мл <i><25 EU/mL</i>

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

Примечание. М — среднее арифметическое значение; S — стандартное отклонение; ВКЭ — вирус клещевого энцефалита; ИФА — иммуноферментный анализ; ПЦР — полимеразная цепная реакция; МИД₅₀ — минимальная иммунизирующая доза, защищающая 50% животных; ЕЭ — единицы эндотоксина.

^а ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

Note. M, arithmetic mean; S, standard deviation; TBEV, tick-borne encephalitis virus; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PCR, polymerase chain reaction; MID₅₀, minimum immunising dose that protects 50% of the animals tested; EU, endotoxin units.

^a OFS.1.2.4.0006.15 Bacterial endotoxins. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. V. 1. Moscow; 2018.

Хроматографический анализ показал, что доля цельновирионной фракции в процессе очистки увеличилась с 6,8 до 98,2%.

При помощи методов электрофореза и иммуноблота с моноклональными и поликлональными антителами к ВКЭ (рис. 3) показано, что в составе очищенного концентрата вакцины «ВероКСЭН» присутствовали основные специфические вирусные белки: мономер гликопротеина Е (рис. 3, зона В, 53–55 кДа), олигомеры гликопротеина Е (зона А, более 116 кДа). Также выявлены мономеры и олигомеры белка С ВКЭ (зона С, молекулярная масса 12,1, 24,2, 36,3 кДа). Часть олигомеров, образовавшихся из вирусных

белков в процессе инактивации формалином, оказалась устойчивой к денатурации, что также подтверждается данными литературы [10, 11].

Готовый препарат соответствовал современным нормативным требованиям, предъявляемым к инактивированным вирусным вакцинам (табл. 1), в том числе по содержанию таких примесей, как ДНК субстратных клеток и БСА. Кроме того, использование аттестованной перевиваемой линии клеток позволило полностью исключить антибиотиков из технологии создания вакцины КЭ.

Изучение стабильности препарата подтвердило соответствие вакцины требованиям нормативной документации через 36 мес. хранения.

Таблица 2. Показатели специфической активности вакцины «ВероКСЭН» и препарата сравнения «ЭнцеВир» в опытах на мышах
Table 2. Potency values of the test vaccine (VeroKSEN) and the comparator vaccine (EnceVir) in mice

Вакцина, серия <i>Vaccine, batch</i>	Специфическая активность вакцины (МИД ₅₀ , мл) для штамма <i>Potency (MID₅₀, mL) for the strain</i>		
	Корзухин (261,0 ЛД ₅₀) <i>Korzukhin (261.0 LD₅₀)</i>	Софьин (749,9 ЛД ₅₀) <i>Sofjin (749.9 LD₅₀)</i>	Абсеттаров (204,3–1000 ЛД ₅₀) <i>Absettarov (204.3–1000 LD₅₀)</i>
ВероКСЭН, Т03 <i>VeroKSEN, T03</i>	0,00125 <i>0.00125</i>	0,00093 <i>0.00093</i>	0,007 <i>0.007</i>
ЭнцеВир, Т67 <i>EnceVir, T67</i>	0,00436 <i>0.00436</i>	0,00246 <i>0.00246</i>	0,003 <i>0.003</i>

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

Примечание. МИД₅₀ — минимальная иммунизирующая доза, защищающая 50% животных; ЛД₅₀ — летальная доза, вызывающая гибель 50% испытываемых животных.

Note. MID₅₀, minimum immunising dose that protects 50% of the animals tested; LD₅₀, lethal dose that kills 50% of the animals tested.

В ходе доклинических исследований вакцины «ВероКСЭН»¹³ изучалось ее местное раздражающее и токсическое воздействие, в том числе репродуктивная токсичность. Кроме того, исследовалась расширенная специфическая активность в биологическом тесте на мышах с применением тест-штаммов «Софьин» (дальневосточный субтип) и «Корзухин» (сибирский субтип). В качестве препарата сравнения использовалась вакцина «ЭнцеВир». Специфическая активность в отношении штамма «Абсеттаров» (западный субтип) оценивалась при контроле качества препаратов.

Полученные данные (табл. 2) свидетельствуют о высокой специфической активности вакцины «ВероКСЭН» против доминирующих на территории России субтипов ВКЭ. Иммуногенность вакцин «ВероКСЭН» и «ЭнцеВир» оказалась выше в испытании штамма «Софьин», несмотря на большую дозу разрешающего заражения по сравнению со штаммом «Корзухин», что, видимо, связано с гомологичностью производственного штамма № 205 и тест-штамма «Софьин», относящихся к дальневосточному генотипу ВКЭ.

Заключение

Исследованы ключевые показатели качества новой вакцины клещевого энцефалита «ВероКСЭН», полученной с использованием перевиваемой линии клеток Vero, а также ее продуктов в опытах на мышах.

Показано, что выбранный режим инактивации снижает инфекционную активность вирусного сбора до недетектируемого уровня через 24 ч, а 72-часовой процесс надежно обеспечивает специфическую безопасность вакцины. При этом антигенная активность сохраняется на уровне около 100% от исходного значения.

Этапы тонкой очистки позволяют получить цельновирионную фракцию с чистотой до 98,2% и удалить технологические примеси (ДНК клеток-продуцентов, БСА, формальдегид, бактериальные эндотоксины и др.) до уровней, соответствующих требованиям национального законодательства.

Вакцина, полученная описанным способом, обладает высокой специфической активностью в отношении западного, сибирского и дальневосточного субтипов вируса клещевого энцефалита. Специфическая активность вакцин для штаммов «Абсеттаров», «Софьин» и «Корзухин», выраженная в МИД₅₀, составила 0,007, 0,00125 и 0,00093 мл соответственно.

Литература/References

1. Riccardi N, Antonello RM, Luzzati R, Zajkowska J, di Bella S, Giacobbe DR, et al. Tick-borne encephalitis in Europe: a brief update on epidemiology, di-

agnosis, prevention, and treatment. *Eur J Intern Med.* 2019;62:1–6.

<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2019.01.004>

¹³ Бутенко А.М., Ларичев В.Ф. Изучение протективной активности вакцины клещевого энцефалита на перевиваемой клеточной линии Vero на мышах линии Balb/c. Отчет по доклиническому исследованию. М.: ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; 2021.

2. Johnson N, Migne CV, Gonzalez G. Tick-borne encephalitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2023;36(3):198–202. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000924>
3. Luan Y, Gou J, Zhong D, Ma L, Yin C, Shu M, et al. The tick-borne pathogens: an overview of China's situation. *Acta Parasitol.* 2023;68(1):1–20. <https://doi.org/10.1007/s11686-023-00658-1>
4. Андаев ЕИ, Никитин АЯ, Толмачева МИ, Зарва ИД, Яцменко ЕВ, Матвеева ВА и др. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2022 г. и прогноз ее развития на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023;(1):6–16. Andaev EI, Nikitin AY, Tolmacheva MI, Zarva ID, Yatsmenko EV, Matveeva VA, et al. Epidemiological situation on tick-borne viral encephalitis in the Russian Federation in 2022 and forecast of its development for 2023. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2023;(1):6–16 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-6-16>
5. Orenstein W, Offit P, Edwards K, Plotkin S. *Plotkin's Vaccines.* 7th ed. Elsevier; 2017.
6. Vidor E, Meschievitz C, Plotkin S. Fifteen years of experience with Vero-produced enhanced potency inactivated poliovirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 1997;16(3):312–22. <https://doi.org/10.1097/00006454-199703000-00011>
7. Vorovitch MF, Grishina KG, Volok VP, Chernokhaeva LL, Grishin KV, Karganova GG, Ishmukhametov AA. Evervac: phase I/II study of immunogenicity and safety of a new adjuvant-free TBE vaccine cultivated in Vero cell culture. *Hum Vaccin Immunother.* 2020;16(9):2123–30. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1757990>
8. Стронин ОВ, Колтунов АА, Епанчинцев АА, Шарова ОИ, Учуватова ЕВ, Дьяконова ЕВ и др. Способ получения вакцины клещевого энцефалита. Патент Российской Федерации № 2678431; 2017. Stronin OV, Koltunov AA, Epanchintsev AA, Sharova OI, Uchuvatova EV, Dyakonova EV, et al. Method for producing tick-borne encephalitis virus vaccine. Patent of the Russian Federation No. 2678431; 2017 (In Russ.).
9. Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 1969;244:4406–12. PMID: [5806584](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5806584/)
10. Zlatkovic J, Tsouchnikas G, Jarmer J, Koessl C, Stiasny K, Heinz FX. Aluminum hydroxide influences not only the extent but also the fine specificity and functional activity of antibody responses to tick-borne encephalitis virus in mice. *J Virol.* 2013;87(22):12187–95. <https://doi.org/10.1128/JVI.01690-13>
11. Heinz FX, Kunz C. Chemical crosslinking of tick-borne encephalitis virus and its subunits. *J Gen Virol.* 1980;46(2):301–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-46-2-301>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **О.В. Стронин** — анализ и обобщение данных литературы, разработка дизайна и концепции исследования, разработка up-stream процессов, разработка и выполнение биологических методов контроля, анализ и интерпретация результатов, формулировка выводов, написание, редактирование, оформление текста рукописи, работа с графическим материалом; **А.А. Епанчинцев** — сбор данных литературы, разработка и выполнение методов очистки, выполнение анализа методами ВЭЖХ, электрофореза, вестерн-блот, сбор и систематизация данных, подготовка части графического материала, критический пересмотр текста рукописи; **А.А. Колтунов** — разработка концепции исследования, критическое обсуждение результатов исследования, критический пересмотр текста рукописи, 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).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **O.V. Stronin** analysed and summarised literature data; designed and conceptualised the study; developed up-stream processes; developed biological control methods and carried out the control; analysed and interpreted the results; formulated the conclusions; drafted, edited, and formatted the manuscript; and worked with graphical material. **A.A. Epanchintsev** collected literature data; developed purification methods and carried out the purification; performed HPLC, electrophoresis, and Western blotting; collected and collated data; contributed to graphical material preparation; and critically reviewed the manuscript. **A.A. Koltunov** elaborated the study concept, critically discussed the study results, critically revised the manuscript, and 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 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 National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya approved animal procedures and manipulations

Процедуры и манипуляции с животными в ходе доклинических исследований рассмотрены и утверждены Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол заседания от 29.12.2020 № 2).

Благодарности. Авторы выражают благодарность И.В. Красильникову, д-ру мед. наук, проф., инициировавшему поисковые исследования. Авторы благодарны всем сотрудникам компании АО «НПО «Микроген», особенно коллегам из филиала «НПО Вирион» (г. Томск), непосредственно участвовавшим в организации, проведении экспериментальных работ, изготовлении и контроле экспериментальных и опытно-промышленных серий, а также сотрудникам административно-хозяйственных подразделений компании, обеспечивших поставку сырья и оборудования.

for the non-clinical study under meeting minutes No. 2 dated December 29, 2020.

Acknowledgements. The authors are grateful to Prof. Igor V. Krasilnikov, who initiated the pilot studies. They express their gratitude to all the employees of Microgen, and especially the employees of its Branch in Tomsk, Virion, who were directly involved in the organisation and performance of the experimental work, as well as the manufacture and quality control of laboratory and pilot-scale batches. Also, the authors would like to thank the employees of the administrative and economic divisions of the company who ensured the supply of raw materials and equipment.

Об авторах / Authors

Стронин Олег Владимирович, канд. мед. наук

Scopus ID: 23475557900

o.v.stronin@microgen.ru

Епанчинцев Антон Александрович

Scopus ID: 57195772463

a.a.epanchintsev@microgen.ru

Колтунов Александр Анатольевич, канд. мед. наук

Scopus ID: 6603661664

a.a.koltunov@microgen.ru

Oleg V. Stronin, Cand. Sci. (Med.)

Scopus ID: 23475557900

o.v.stronin@microgen.ru

Anton A. Epanchintsev

Scopus ID: 57195772463

a.a.epanchintsev@microgen.ru

Aleksandr A. Koltunov, Cand. Sci. (Med.)

Scopus ID: 6603661664

a.a.koltunov@microgen.ru

Поступила 20.06.2023

После доработки 29.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 20 June 2023

Revised 29 August 2023

Accepted 13 September 2023



Разработка оптимальных условий нанофильтрации в технологии производства иммуноглобулина G человека нормального для внутривенного введения

Н.В. Зубкова¹, А.М. Николаева¹, А.В. Иванов^{1,✉}, О.В. Белякова¹, М.В. Разумихин¹,
Н.В. Винокурова¹, И.С. Ефимова¹, Т.И. Смолянова², Е.И. Саканян¹

¹ Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», 2-й Волконский переулок, д. 10, Москва, 127473, Российская Федерация

² Акционерное общество «Национальная иммунобиологическая компания», 2-й Волконский переулок, д. 10, Москва, 127473, Российская Федерация

✉ Иванов Александр Викторович; a.v.ivanov@microgen.ru

Резюме

Актуальность. Лекарственные препараты на основе иммуноглобулина G (IgG) из плазмы крови человека широко применяются в терапии бактериальных и вирусных инфекций, первичных и вторичных иммунодефицитов, аутоиммунных заболеваний. Снизить риск производственной контаминации сырья различными патогенами, в том числе вирусами, позволяет процесс нанофильтрации. Для повышения вирусной безопасности необходимы исследования по разработке и внедрению дополнительных этапов инактивации и (или) элиминации вирусов.

Цель. Разработка оптимальных условий процесса нанофильтрации, валидация и масштабирование данной стадии для производства лекарственного препарата иммуноглобулина G человека для внутривенного введения.

Материалы и методы. Раствор IgG из фракции II+III плазмы крови, нанофильтры Planova — 20N и BioEx (Asahi Kasei, Япония), Viresolve Pro (Merck Millipore, США), Virosart — HC и HF (Sartorius, Германия), Pegasus — SV4 и Prime (Pall, США), предфильтры Sartopore из полиэфирсульфона, Virosart MAX (Sartorius, Германия) из полиамида, ЕКХ-Р (Pall, Германия) из регенерированной целлюлозы. Лабораторные исследования по валидации вирусной редукции выполняли с модельными тест-вирусами (ВИЧ-1, трансмиссивного гастроэнтерита (коронавируса) свиней, парвовирус свиней, вирус энцефаломиокардита мышей, вирус бычьей диареи) на базе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Анализ данных по выборке проводили с помощью среднего значения при 95% доверительном интервале.

Результаты. Установлено, что производительность нанофильтрации для всех выбранных комбинаций «предфильтр — нанофильтр» зависит от концентрации IgG в испытуемом растворе. Максимальная пропускная способность и выход продукта составили: предфильтр (фильтр) ЕКХ-Р с нанофильтром Pegasus SV4 — 6300 г/м² (выход IgG более 95%); ЕКХ-Р или Sartopore (полиэфирсульфон) с Planova 20N — до 2980 г/м² (выход IgG — практически 100% при условии проведения процесса только при концентрации IgG 10 г/л). Для разных комбинаций фильтров уровень редукции соответствовал критериям приемлемости: ВИЧ-1 — от 4,00±0,05 до 4,75±0,04 log₁₀; коронавирус свиней — от 4,30±0,04 до 4,55±0,06 log₁₀; вирус энцефаломиокардита мышей — от 5,38±0,08 до 5,57±0,04 log₁₀; вирус бычьей диареи — более 5,00 log₁₀; парвовирус свиней — от 5,12±0,10 до 5,25±0,08 log₁₀. Статистически достоверного различия в зависимости уровня редукции от марки предфильтров не выявили.

Выводы. Подтверждена эффективность противовирусной нанофильтрации для вирусов с различными размерами вириона и физико-химическими характеристиками, включая мелкий парвовирус B19: уровень редукции вирусов для всех комбинаций составил более $4 \log_{10}$, что соответствует критериям приемлемости. Разработанные в лабораторных условиях параметры и соответствующая им длительность нанофильтрации, а также выход целевого продукта для всех комбинаций исследованных фильтров не изменились при масштабировании. Нанофильтрация может служить эффективным и высокопродуктивным инструментом удаления различных типов вирусов, который не влияет на качество продукта и значительно повышает вирусную безопасность биологических препаратов.

Ключевые слова: иммуноглобулин G человека нормальный; нанофильтрация; производственный процесс; оптимизация; вирусная безопасность; валидация вирусной редукции

Для цитирования: Зубкова Н.В., Николаева А.М., Иванов А.В., Белякова О.В., Разумихин М.В., Винокурова Н.В., Ефимова И.С., Смолянова Т.И., Саканян Е.И. Разработка оптимальных условий нанофильтрации в технологии производства иммуноглобулина G человека нормального для внутривенного введения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):400–410. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-400-410>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

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

Determination of optimum nanofiltration conditions for the manufacturing process of human normal immunoglobulin G for intravenous administration

Nataliya V. Zubkova¹, Alevtina M. Nikolaeva¹, Alexander V. Ivanov^{1,✉},
Olga V. Beliakova¹, Mikhail V. Razumikhin¹, Natalia V. Vinokurova¹, Irina S. Efimova¹,
Tatiana I. Smolyanova², Elena I. Sakanyan¹

¹ Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, 10 2nd Volkonsky Ln., Moscow 127473, Russian Federation

² National Immunobiological Company, 10 2nd Volkonsky Ln., Moscow 127473, Russian Federation

✉ Alexander V. Ivanov; a.v.ivanov@microgen.ru

Abstract

Scientific relevance. Medicinal products based on immunoglobulin class G (IgG) from human plasma are widely used in clinical practice to treat bacterial and viral infections, primary and secondary immunodeficiencies, and autoimmune diseases. Nanofiltration is a way to mitigate the risk of in-process contamination of raw materials with various pathogens, including viruses. Therefore, it is relevant to investigate the development and implementation of additional viral inactivation and/or elimination steps.

Aim. This study aimed to develop and validate optimum nanofiltration conditions and to scale up the nanofiltration step for the manufacturing of human IgG for intravenous administration.

Materials and methods. The study used a solution of IgG from plasma fractions II and III. The authors paired nanofilters manufactured by Planova 20N and BioEx (Asahi Kasei, Japan), Viresolve Pro (Merck Millipore, USA), Virosart HC and HF (Sartorius, Germany), and Pegasus SV4 and Prime (Pall, USA) with Sartopore polyethersulphone prefilters by Sartorius (Germany), Virosart MAX polyamide prefilters by Sartorius (Germany), and EKX-P regenerated cellulose prefilters by Pall (Germany). Virus reduction validation studies were performed with model viruses (human immunodeficiency virus type 1, porcine transmissible gastroenteritis virus, porcine parvovirus, murine encephalomyocarditis virus, and bovine viral diarrhoea virus) in the

laboratories of the N.F. Gamaleya centre. The sample data analysis involved calculating mean values with 95% confidence intervals.

Results. For all the selected combinations of prefilters and filters, the maximum nanofiltration throughput depended on the IgG concentration in the test solution. With the combination of an EKX-P filter with a Pegasus SV4 nanofilter, the maximum throughput and the IgG yield reached 6300 g/m² and 95%, respectively. When combined with a Planova 20N nanofilter, EKX-P and Sartopore (polyethersulphone) filters provided a maximum throughput of up to 2980 g/m² and an IgG yield of almost 100%, provided that the test solution had an IgG concentration of 10 g/L. With different filter combinations, virus reduction levels ranged from 4.00±0.05 to 4.75±0.04 log₁₀ for human immunodeficiency virus type 1, from 4.30±0.04 to 4.55±0.06 log₁₀ for porcine transmissible gastroenteritis virus, from 5.38±0.08 log₁₀ to 5.57±0.04 log₁₀ for murine encephalomyocarditis virus, 5.12±0.10 log₁₀ to 5.25±0.08 log₁₀ for porcine parvovirus, and exceeded 5.00 log₁₀ for bovine viral diarrhoea virus. The virus reduction levels achieved were not statistically associated with prefilter brands.

Conclusions. The study demonstrated that nanofiltration was effective at removing viruses with various virion sizes and physicochemical characteristics, including viruses as small as parvovirus B19. The levels of virus reduction exceeded 4 log₁₀ and met the acceptance criteria. The laboratory-scale nanofiltration parameters and the corresponding filtration times, as well as IgG yields, did not change when the process was scaled up. Therefore, nanofiltration is an effective and productive technique that helps eliminate various types of viruses and considerably improve viral safety without affecting the quality of biological medicinal products.

Key words: human normal immunoglobulin G; nanofiltration; production process; optimisation; virus safety; viral reduction validation

For citation: Zubkova N.V., Nikolaeva A.M., Ivanov A.V., Belyakova O.V., Razumikhin M.V., Vinokurova N.V., Efimova I.S., Smolyanova T.I., Sakanyan E.I. Determination of optimum nanofiltration conditions for the manufacturing process of human normal immunoglobulin G for intravenous administration. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3–1):400–410. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-400-410>

Funding. The study was performed without external funding.

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

Введение

Лекарственные препараты из плазмы крови человека на основе иммуноглобулина класса G (IgG) широко применяются в клинической практике для терапии бактериальных и вирусных инфекций, первичных и вторичных иммунодефицитов, аутоиммунных заболеваний. При некоторых нозологических формах необходимо введение в больших дозах непосредственно в кровяное русло, что требует разработки особых подходов к обеспечению качества и безопасности таких препаратов [1, 2].

Перечень инфекционных угроз, ассоциированных с плазмой крови человека, обширен, из них наиболее опасна вирусная контаминация сырья. Очевидно, что обеспечение безопасности по отношению к потенциально содержащимся в исходной плазме человека вирусам — одна из основных задач, стоящих перед разработчиками и производителями препаратов крови [3, 4]. Традиционные технологические стадии очистки на производстве — спиртовое фракционирование, хроматография, а также специальные методы инактивации вирусов — недостаточно

эффективны, особенно в отношении мелких безоболочечных вирусов. Это подтверждается данными о случаях посттрансфузионных осложнений после применения препаратов крови [5].

К концу 1990-х годов развитие наук о материалах позволило разработать и вывести на рынок фильтры с размером пор 35 нм, а позднее — 20 нм, которые исключают проникновение через них соответствующих вирусных частиц. В настоящее время на рынке представлены противовирусные фильтры с разным механизмом действия (на основе неспецифической адсорбции, ионообменного захвата патогенных агентов и др.). Нанофильтрация — это наиболее перспективная и воспроизводимая инновационная технология, созданная на основе мембранной фильтрации, но отличающаяся фильтрами с меньшим размером пор [6–8].

Однако при использовании нанофильтрации в реальном производстве, особенно когда речь идет о таких крупных белковых молекулах, как IgG, возникают технологические препятствия: большая длительность стадии фильтрации, часто встречающееся механическое

повреждение мембран, небольшой ресурс нанофильтров, что обусловлено прежде всего очень малым размером пор фильтрующих материалов [6]. Как следствие, формируется относительно высокая себестоимость стадии нанофильтрации.

Цель работы — разработка оптимальных условий процесса нанофильтрации, валидация и масштабирование данной стадии для производства лекарственного препарата иммуноглобулина G человека для внутривенного введения.

Задачи исследования:

- выбор оптимальных условий процесса нанофильтрации;
- исследование разных комбинаций фильтров лабораторного масштаба;
- валидация (подтверждение эффективности) вирусной очистки с использованием широкого спектра модельных вирусов;
- масштабирование процесса в производственных условиях.

Материалы и методы

Раствор IgG для проведения испытаний был получен из фракции II+III плазмы крови в соответствии с экспериментально-производственным регламентом. Основные качественные характеристики препарата, а именно прозрачность, цветность, фракционный состав, молекулярный состав и содержание иммуноглобулинов класса G, соответствовали требованиям ФС.3.3.2.0008.15¹.

В исследование были включены лабораторные нанофильтры производства Planova — 20N и BioEx (Asahi Kasei, Япония), Viresolve Pro (Merck Millipore, США), Virosart — HC и HF (Sartorius, Германия), Pegasus — SV4 и Prime (Pall, США), с площадью фильтрации от 3,1 до 10,0 см². В качестве предфильтров использовали фильтры Sartopore из полиэфирсульфона (PES), диаметр пор — 0,1 мкм; Virosart MAX (Sartorius, Германия) из полиамида — 0,1 мкм; EKX-P (Pall, Германия) из регенерированной целлюлозы (RC) — 0,05–0,2 мкм.

Система для испытания фильтров включала фильтродержатель, компрессор (источник давления), емкость для фильтрата и весы. Исследования проводили при комнатной температуре

и постоянном рабочем давлении (0,8–3,0 бар в зависимости от рекомендаций производителей), которое регулировали с помощью прецизионного регулятора.

Производственные параметры нанофильтрации оценивали по следующим показателям: общая потеря целевого белка (г), производительность (г/м²/мин), пропускная способность (г/м²). Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим² и биуретовым методом³.

Физико-химические свойства препаратов оценивали методами, рекомендованными Государственной фармакопеей Российской Федерации⁴. Исследования по валидации (оценке эффективности вирусной редукции) выполнены в соответствии с Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза⁵.

В основу методики положено искусственное создание вирусной нагрузки в исходном материале с последующим определением остаточной вирусной нагрузки (инфекционности) в целевой фракции после нанофильтрации. Для каждого вируса и комбинации фильтров выполнено по три и более опыта.

Использовали модельные тест-вирусы для контаминации сырья: вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), трансмиссивного гастроэнтерита свиней (коронавируса свиней), энцефаломиокардита мышей, парвовируса свиней, вирусной диареи — болезни слизистых крупного рогатого скота (вируса бычьей диареи). Модельные тест-вирусы культивировали на чувствительных клеточных линиях в среде DMEM (модифицированная способом R. Dulbecco, среда Игла), содержащей термоинактивированную эмбриональную телячью сыворотку (HyClone, США), глутамин и антибиотики. Исследования с модельными тест-вирусами были выполнены на базе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Характеристика вирусов из модельных экспериментов представлена в *таблице 1*.

Раствор с материалом, содержащим вирусы, добавляли в растворы IgG непосредственно перед началом модельного процесса в количестве не более 10% от объема раствора IgG, конечная концентрация составля-

¹ ФС.3.3.2.0008.15 Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

² ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

³ ОФС.1.8.2.0010.18 Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

⁴ ФС.3.3.2.0008.15 Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁵ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (с изменениями на 15.07.2022).

Таблица 1. Характеристика вирусов, использованных для моделирования вирусной нагрузки
Table 1. Characteristics of the viruses used in viral load models

Вирус <i>Virus</i>	Штамм <i>Strain</i>	Семейство <i>Family</i>	Геном <i>Genome</i>	Наличие липидной оболочки <i>Lipid envelope</i>	Размер, нм <i>Size, nm</i>	Клеточная линия <i>Cell line</i>
ВИЧ-1 <i>HIV-1</i>	HIV-1899A	<i>Retroviridae</i>	оцРНК <i>ssRNA</i>	+	100–120	MT-4
ТГСВ <i>TGEV</i>	ГКВ 2378 <i>GKV 2378</i>	<i>Coronaviridae</i>	оцРНК <i>ssRNA</i>	+	120–160	SPEV
ПВСв <i>PPV</i>	И-82 <i>I-82</i> ГКВ 2448 <i>GKV 2448</i>	<i>Parvoviridae</i>	дцДНК <i>dsDNA</i>	–	18–26	PK-15
ЭМКВ <i>EMCV</i>	ЕМС <i>EMC</i> ГКВ 787 <i>GKV 787</i>	<i>Picornaviridae</i>	оцРНК <i>ssRNA</i>	–	25–30	L929
ВД–БС КРС <i>BVDV</i>	Т-04 <i>T-04</i> ГКВ 2390 <i>GKV 2390</i>	<i>Flaviviridae</i>	оцРНК <i>ssRNA</i>	+	40–60	MDBK

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

Примечание. ВИЧ-1 — вирус иммунодефицита человека, тип 1; ТГСВ — трансмиссивный гастроэнтерит свиней (коронавирус свиней); ПВСв — парвовирус свиней; ЭМКВ — вирус энцефаломиокардита мышей; ВД–БС КРС — вирус бычьей диареи; MT-4 — перевиваемые лимфобластоидные клетки человека; SPEV — культура клеток почки эмбриона свиньи; PK-15 — культура клеток почек свиньи; L929 — клеточная линия фибробластов мыши, подкожная ткань; MDBK — культура клеток почек теленка; оцРНК — одноцепочечная (двухспиральная) РНК; дцДНК — двухцепочечная (двухспиральная) ДНК.

Note. HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; TGEV, porcine transmissible gastroenteritis virus (porcine coronavirus); PPV, porcine parvovirus; EMCV, murine encephalomyocarditis virus; BVDV, bovine viral diarrhoea virus; MT-4, continuous human lymphoblastoid cell line; SPEV, embryonic porcine kidney cell line; PK-15, porcine kidney cell line; L929, mouse fibroblast cell line (subcutaneous tissue); MDBK, Madin–Darby bovine kidney cell line; ssRNA, single-stranded (double-helical) RNA; dsDNA, double-stranded (double-helical) DNA.

ла не менее $5 \log_{10}$ в соответствующих единицах измерения. Для каждого опыта использовали индивидуальный комплект фильтров, предфильтров и расходных материалов. Отбор проб проводили до и после процесса противовирусной фильтрации.

Инфекционную активность вирусов определяли методом 10-кратного титрования проб на чувствительной клеточной линии, выращенной в монослое на 96-луночных планшетах, по достижении максимального проявления цитопатического эффекта в монослое клеток (дополнительно для ВИЧ-1 — при обнаружении вирус-индуцированных синцитиев и накоплении антигена р24 ВИЧ). Титрование вирусов проводили методом Риды–Менча⁶ и выражали в $\log_{10}$ ТЦИД₅₀/мл (50% тканевой цитопатической инфекционной дозы).

Фактор редукции (RF) вирусов оценивали по изменению вирусной нагрузки в исследуемых пробах до и после нанофильтрации:

$$RF = \log \left(\frac{V(m)_1 \times T_1}{V(m)_2 \times T_2} \right), \quad (1)$$

где $V(m)_1$ — объем (масса) образца перед фильтрацией, мл (г); $V(m)_2$ — объем (масса) образца после фильтрации, мл (г); T_1 — титр (концентрация) вируса (на 1 мл в образце перед фильтрацией); T_2 — титр (концентрация) вируса (на 1 мл в образце после фильтрации), или предел обнаружения вируса для конкретной аналитической методики.

Статистическую обработку данных проводили с применением программного обеспечения Microsoft Excel, анализ данных по выборке — при помощи среднего значения при 95% доверительном интервале.

Результаты и обсуждение

Основное сырье для производства иммуноглобулинов — плазма крови для фракционирования, которая может быть контаминирована различ-

⁶ Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*. 1938;27(3):493-7.

ными патогенными агентами [6–8]. При выборе технических характеристик нанофильтров для производства биопрепаратов учитывают прежде всего потенциальные риски, связанные с загрязнением сырья вирусами, а затем — данные о структуре и свойствах целевых молекул. Такие важные характеристики, как размер вирионов, наличие или отсутствие липидной оболочки и строение генома, могут оказать влияние на эффективность инактивирующих процедур. Характеристика основных семейств вирусов, циркулирующих в донорской популяции и представляющих опасность с точки зрения контаминации плазмы для фракционирования, особенно при формировании больших производственных пулов, представлена на рисунке 1.

Риск контаминации плазмы не равнозначен в случае разных типов вирусов и зависит от многих факторов. Существует ряд основных гемотрансмиссивных инфекций, которые развиваются под действием вирусов гепатита С, гепатита В, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, и тестирование на маркеры данных патогенов обязательно для каждого донора. Однако в исходном сырье с определенной долей вероятности могут присутствовать и другие вирусы. По результатам выполненных ранее исследований установлено, что один из наиболее распространенных агентов, которым могут быть контаминированы производственные пулы

плазмы, — парвовирус В19. Линейный размер его вирионов 22–24 нм, поэтому в нашей работе использовались нанофильтры с размером пор не более 20 нм [9].

Известно, что условный размер молекулы IgG в поперечном диаметре составляет около 10–15 нм, это меньше размера пор нанофильтров, но сопоставимо. Вследствие этого для проведения исследований выбрали высокоочищенную хроматографическую фракцию иммуноглобулина, не содержащую агрегированных молекул.

Для оптимизации параметров нанофильтрации в исследование включили фильтры с различными по типу и материалу мембранами — половолоконными и листовыми PES, PVDF (поливинилиденфторид), RC. Основные технические характеристики фильтров перечислены в таблице 2.

Для выявления оптимальных параметров нанофильтрации использовали нанофильтры и предфильтры лабораторного масштаба, в дальнейшем проводили масштабирование для производственного процесса. Предварительно в серии экспериментов установили, что производительность нанофильтрации для всех выбранных комбинаций «предфильтр — нанофильтр» зависит от концентрации IgG в испытуемом растворе. Оптимальную концентрацию белка оценивали по снижению выхода IgG: для большинства

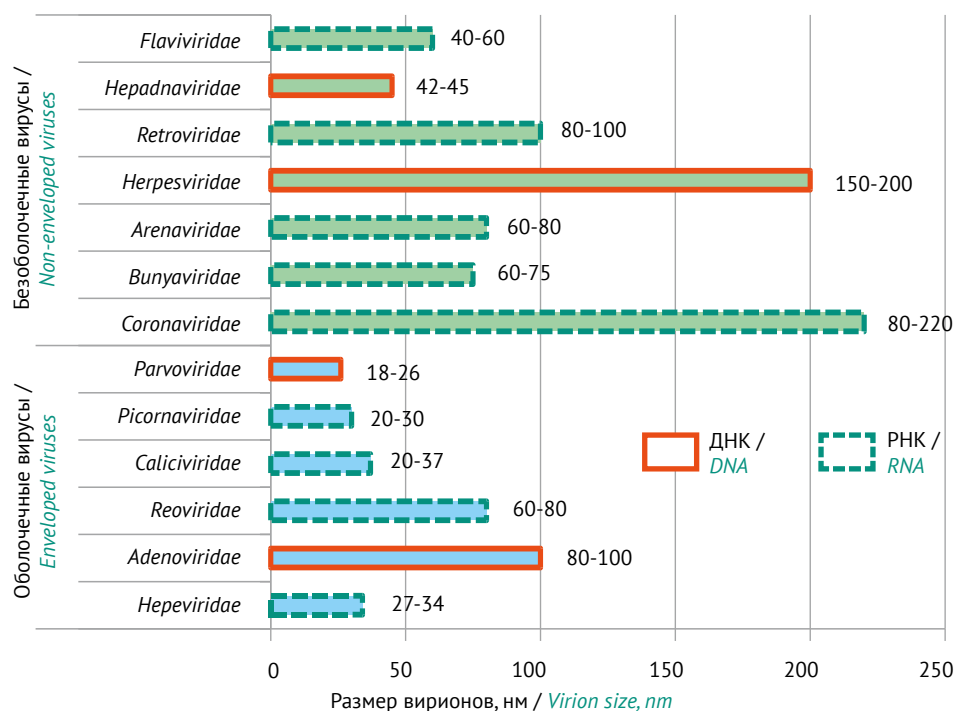


Рисунок из источника [6] переработан авторами / The figure is adapted by the authors from [6]

Рис. 1. Характеристика основных вирусов, циркулирующих в популяции человека.

Fig. 1. Description of the main viruses circulating in the human population.

Таблица 2. Характеристика исследуемых противовирусных фильтров
Table 2. Characteristics of the antiviral filters used in the study

Производитель <i>Manufacturer</i>	Наименование фильтра <i>Filter name</i>	Размер пор, нм <i>Pore size, nm</i>	Рабочее давление для фильтра, бар <i>Filter operating pressure, bar</i>	Материал мембраны фильтра <i>Filter membrane material</i>	Тип мембраны <i>Membrane type</i>	Площадь лабораторно- го фильтра, см ² <i>Laboratory- scale filter area, cm²</i>	Диапазон номи- нальной фильтрующей площади, м ² <i>Nominal filtration area range, m²</i>
Sartorius (Германия/ <i>Germany</i>)	Virosart HC	20	≤2,00	PES	Лист <i>Flat sheet</i>	5,0	0,0005–2,7000
	Virosart HF	20	≤2,00	PES	Полое волокно <i>Hollow fiber</i>	5,0	0,00017– 14,4000
Asahi Kasei (Япония/ <i>Japan</i>)	Planova BioEx	18	≤3,40	PVDF	Полое волокно <i>Hollow fiber</i>	10,0	0,0003–4,0000
	Planova 20N	19	≤0,98	RC	Полое волокно <i>Hollow fiber</i>	10,0	0,001–4,000
Pall (США/ <i>USA</i>)	Pegasus SV4	20	≤3,10	PVDF	Лист <i>Flat sheet</i>	9,6	0,00096– 2,25000
	Pegasus Prime	20	≤3,10	PES	Лист <i>Flat sheet</i>	2,8	0,00028– 3,00000
Merck Millipore (США/ <i>USA</i>)	Viresolve Pro	20	≤2,00	PES	Лист <i>Flat sheet</i>	3,4	0,00034– 1,53000

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

Примечание. PES – полиэфирсульфон; PVDF – поливинилиденфторид; RC – регенерированная целлюлоза.

Note. PES, polyethersulphon; PVDF, polyvinylidene fluoride; RC, regenerated cellulose.

комбинаций фильтров она составила 10 г/л и менее. Однако для некоторых комбинаций удовлетворительные результаты были получены при концентрации белка до 27 и 34,5 г/л. Также экспериментально установили факт снижения скорости фильтрации из-за закупорки мембранных пор механическими примесями, которые присутствовали в исследуемом растворе. Как правило, в течение первых 1,5 ч не было зафиксировано значительных различий в производительности (г/м²/мин) как листовых, так и полволоконных фильтров разных производителей, однако постепенно скорость фильтрации замедлялась, а для отдельных комбинаций достигала нулевого значения. Результаты измерения пропускной способности различных комбинаций фильтров (г/м²) в течение 8 ч фильтрации представлены на рисунке 2.

По результатам оценки лабораторной производительности фильтров, а также с учетом их стоимости, в том числе для полномасштабного производственного процесса, для проведения нанофильтрации установили оптимальные комбинации «предфильтр – нанофильтр»,

из которых наилучшие результаты показало сочетание ЕКХ-Р (RC) с Pegasus SV4 (PVDF), а также комбинации ЕКХ-Р (RC) или Sartopore (PES) с Planova 20N (RC).

В дальнейшем процесс нанофильтрации масштабировали для производства. Установили, что в случае комбинации фильтров ЕКХ-Р и SV4 пропускная способность стадии – около 6300 г/м², а выход целевого продукта (IgG) – более 95%. Дополнительное технологическое преимущество данной комбинации фильтров проявилось в возможности работать с раствором IgG, а при концентрации белка 27 г/л – работать без существенного изменения выхода продукта. При фильтрации раствора иммуноглобулина с помощью комбинации ЕКХ-Р (RC) или Sartopore (PES) с Planova 20N максимальная пропускная способность была в диапазоне от 930 до 2980 г/м². Фильтр Planova 20N дал практически 100% выход целевого продукта, но процесс можно было вести только при концентрации IgG 10 г/л.

При внедрении нанофильтрации (как и любой другой технологической стадии вирусной

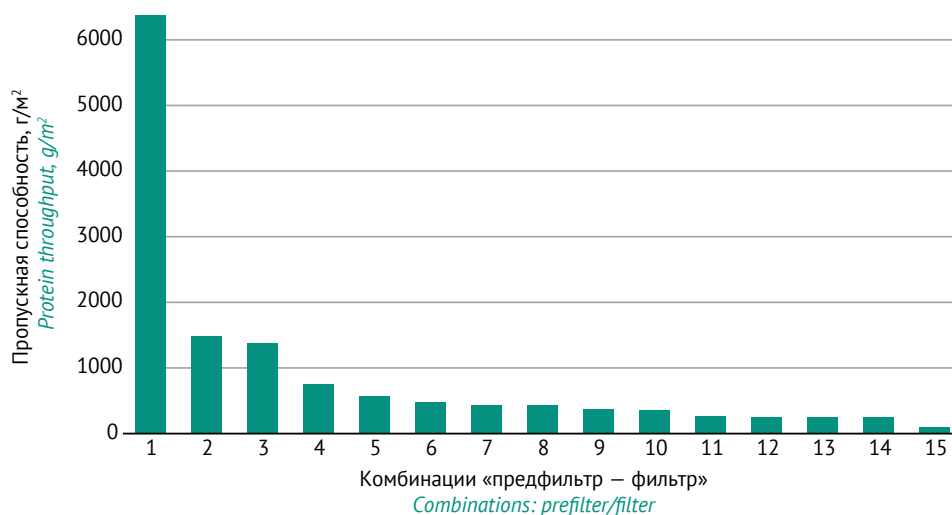


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Пропускная способность исследованных комбинаций предфильтров и нанофильтров. Предфильтр/фильтр/концентрация белка в растворе: 1 – Pegasus SV4 (PVDF)/EKX-P (RC)/27,4 г/л; 2 – Planova 20N (RC)/EKX (RC)/10 г/л; 3 – Planova BioEx (PVDF)/EKX-P (RC)/34,5 г/л; 4 – Planova 20N (RC)/Sartopore (PES)/10 г/л; 5 – Planova 20N (RC)/Sartopore (PES)/15 г/л; 6 – Planova BioEx (PVDF)/Sartopore (PES)/10 г/л; 7 – Virosart HC (PES)/Virosart Max (PA)/10 г/л; 8 – Virosart HC (PES)/Sartopore (PES)/10 г/л; 9 – Viresolve Pro (PES)/Sartopore (PES)/10 г/л; 10 – Virosart HF (PES)/Sartopore (PES)/10 г/л; 11 – Virosart HC (PES)/Sartopore (PES)/27,4 г/л; 12 – Planova 20N (RC)/Sartopore (PES)/27,4 г/л; 13 – Viresolve Pro (PES)/Sartopore (PES)/15 г/л; 14 – Planova 20N (RC)/EKX-P (RC)/34,5 г/л; 15 – Pegasus Prime (PES)/Sartopore (PES)/10 г/л. PES – полиэфирсульфон; PVDF – поливинилиденфторид; RC – регенерированная целлюлоза.

Fig. 2. Throughputs of various combinations of prefilters and nanofilters. Prefilter/filter/protein solution concentration: 1, Pegasus SV4 (PVDF)/EKX-P (RC)/27.4 g/L; 2, Planova 20N (RC)/EKX-P (RC)/10 g/L; 3, Planova BioEx (PVDF)/EKX-P (RC)/34.5 g/L; 4, Planova 20N (RC)/Sartopore (PES)/10 g/L; 5, Planova 20N (RC)/Sartopore (PES)/15 g/L; 6, Planova BioEx (PVDF)/Sartopore (PES)/10 g/L; 7, Virosart HC (PES)/Virosart Max (PA)/10 g/L; 8, Virosart HC (PES)/Sartopore (PES)/10 g/L; 9, Viresolve Pro (PES)/Sartopore (PES)/10 g/L; 10, Virosart HF (PES)/Sartopore (PES)/10 g/L; 11, Virosart HC (PES)/Sartopore (PES)/27.4 g/L; 12, Planova 20N (RC)/Sartopore (PES)/27.4 g/L; 13, Viresolve Pro (PES)/Sartopore (PES)/15 g/L; 14, Planova 20N (RC)/EKX-P (RC)/34.5 g/L; 15, Pegasus Prime (PES)/Sartopore (PES)/10 g/L. PES, polyethersulphon; PVDF, polyvinylidene fluoride; RC, regenerated cellulose.

редукции) в производственный процесс требуется доказательство ее эффективности в редукции вирусных контаминантов из плазмы. План валидационных исследований разрабатывают после установления производственных параметров процесса, но валидацию выполняют только в лабораторных условиях. Для этого проводят обратное масштабирование: расчет необходимого объема раствора IgG и количества суспензии, содержащей вирусы, для лабораторных модельных экспериментов, исходя из расчета нагрузки на 1 м² фильтра. Параметры обратного масштабирования производственного процесса для нанофильтров Pegasus SV4 и Planova 20N представлены в таблице 3.

Для проведения валидации вирусной редукции выбрали модельные вирусы с различными свойствами. Все вирусы, использованные в экспериментах, представлены в таблице 1. При оптимальных параметрах нанофильтрации с комбинацией «предфильтр – фильтр» экспериментально установили уровень редукции вирусов: ВИЧ-1 – от 4,00±0,05 до 4,75±0,04 log₁₀; коронавируса свиней – от 4,30±0,04 до 4,55±0,06 log₁₀; парво-

вируса свиней – от 5,12±0,10 до 5,25±0,08 log₁₀; энцефаломиокардита мышей – от 5,38±0,08 до 5,57±0,04 log₁₀; вируса бычьей диареи – более 5,00 log₁₀. Не установлено статистически достоверного различия в зависимости уровня редукции от марки предфильтров. Графические результаты редукции вирусов при нанофильтрации для двух комбинаций «предфильтр – фильтр» представлены на рисунке 3.

По результатам сравнения физико-химических и биологических характеристик IgG после нанофильтрации с исходными значениями установили, что нанофильтрация не влияет на характеристики продукта и все серии имеют сопоставимые качественные характеристики по всем физико-химическим и биологическим показателям, включая функцию Fc-фрагмента, антикомплементарную активность, содержание специфических антител. Не выявлено изменений в распределении подклассов иммуноглобулинов, при этом содержание мономеров и димеров IgG для некоторых экспериментов увеличилось с 97,3±0,2 до 99,1±0,3%, что свидетельствует об удалении олигомеров из продуктов во время

Таблица 3. Параметры моделирования противовирусной фильтрации для разных нанофильтров в лабораторном и производственном масштабе

Table 3. Parameters of laboratory-scale and production-scale models of antiviral filtration steps with different nanofilters

Масштаб <i>Scale</i>	Параметр <i>Parameter</i>				
	Площадь фильтра <i>Filter area</i>	Объем раствора IgG <i>IgG solution volume</i>	Максимальное давление, бар <i>Maximum pressure, bar</i>	Характеристика раствора IgG (концентрация белка, %) <i>IgG solution concentration, %</i>	Время фильтрации, ч <i>Filtration time, h</i>
Нанофильтр Planova 20N / <i>Planova 20N nanofilter</i>					
Производственный <i>Production</i>	1 м² <i>1 m²</i>	До 100 л <i>Up to 100 L</i>	0,8–0,9	1	8–10
Лабораторный (1:1000) <i>Laboratory (1:1000)</i>	10 см² <i>10 cm²</i>	75–85 мл <i>75–85 mL</i>	0,8–0,9		8–10
Нанофильтр Pegasus SV4 / <i>Pegasus SV4 nanofilter</i>					
Производственный <i>Production</i>	0,25 м² <i>0.25 m²</i>	20–30 л <i>20–30 L</i>	2,9–3,1	2,7	4–6
Лабораторный (1:1000) <i>Laboratory (1:1000)</i>	9,6 см² <i>9.6 cm²</i>	107–121 мл <i>107–121 mL</i>	2,9–3,1		4–6

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

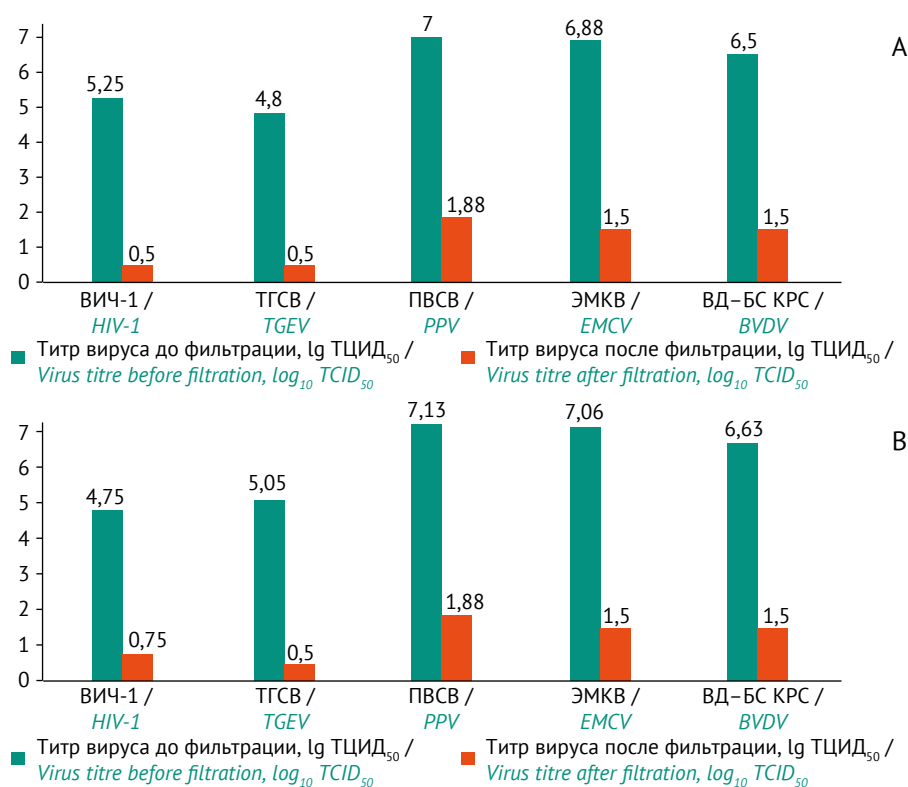


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Редукция вирусов при нанофильтрации с разными комбинациями «предфильтр – фильтр». А – Planova 20N и Sartopore; Б – Pegasus SV 40 и ЕКХ-Р. Ось ОХ – модельные тест-вирусы, ОУ – титр вируса. ТЦИД₅₀ – 50% тканевой цитопатической инфекционной дозы, ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека, тип 1, ТГСВ – трансмиссивный гастроэнтерит свиней (коронавирус свиней), ПВСВ – парвовирус свиней, ЭМКВ – вирус энцефаломиокардита мышей, ВД-БС КРС – вирус диареи – болезни слизистых крупного рогатого скота.

Fig. 3. Virus reduction with nanofiltration using different combinations of filters and prefilters: А, Planova 20N and Sartopore; Б, Pegasus SV 40 and EKX-P. HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; TGEV, porcine transmissible gastroenteritis virus (porcine coronavirus); PPV, porcine parvovirus; EMCV, murine encephalomyocarditis virus; BVDV, bovine viral diarrhoea virus; TCID₅₀, 50% tissue culture infectious dose. The X-axis represents model test-viruses; the Y-axis shows virus titres.

противовирусной фильтрации и повышении качества конечного продукта.

Закключение

Производительность нанофильтрации для всех выбранных комбинаций «предфильтр – нанофильтр» зависит от концентрации IgG в испытуемом растворе. При максимальной пропускной способности (6300 г/м²) выход IgG составил более 95%.

Результаты подтвердили эффективность нанофильтрации для удаления вирусов с различными размерами вириона и физико-химическими характеристиками, включая парвовирус B19 и другие мелкие безоболочечные вирусы. Установленный уровень редукции для всех комбинаций «предфильтр – фильтр» составил более 4 log₁₀, что соответствует критериям приемлемости.

Литература/References

1. Киргизов КИ. Терапия внутривенными иммуноглобулинами в детской гематологии-онкологии и при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. 2018;5(2):32–9.
Kirgizov KI. Therapy with intravenous immunoglobulins in pediatric hematology-oncology and transplantation of hematopoietic stem cells. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 2018;5(2):32–9 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17650/2311-1267-2018-5-2-32-39>
2. Radomski K, Lattner G, Schmidt T, Römisch J. Pathogen safety of a new intravenous immune globulin 10% liquid. *BioDrugs*. 2017;31(2):125–34.
<https://doi.org/10.1007/s40259-017-0212-y>
3. Соломай ТВ, Семененко ТА, Каражас НВ, Рыбалкина ТН, Корниенко МН, Бошьян РЕ и др. Оценка риска инфицирования герпесвирусами при переливании донорской крови и ее компонентов. *Анализ риска здоровью*. 2020;(2):135–42.
Solomay TV, Semenenko TA, Karazhas NV, Rybalkina TN, Kornienko MN, Boshyan RE, et al. Assessing risks of infection with herpes viruses during transfusion of donor blood and its components. *Health Risk Analysis*. 2020;(2):135–42 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.15>
4. Crabol Y, Terrier B, Rozenberg F, Pestre V, Legendre C, Hermine O, et al. Intravenous immunoglobulin therapy for pure red cell aplasia related to human parvovirus B19 infection: a retrospective study of 10 patients and review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2013;56(7):968–77.
5. Ma S, Pang G, Shao Y, Hongo-Hirasaki T, Shang M, Inouye M, et al. Validation and implementation of Planova™ BioEX virus filters in the manufacture of a new liquid intravenous immunoglobulin in China. *Biologicals*. 2018;52:37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2018.01.004>
6. Shokri Doodeji M, Zerafat MM. A review on the applications of nanofiltration in virus removal and pharmaceutical industries. *Glob J Nanomed*. 2018;3(5):555624.
<https://doi.org/10.19080/GJN.2018.03.555624>
7. Caballero S, Diez JM, Belda FJ, Otegui M, Herring S, Roth N, et al. Robustness of nanofiltration for increasing the viral safety margin of biological products. *Biologicals*. 2014;42(2):79–85.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.10.003>
8. Inouye M, Burnouf T. The role of nanofiltration in the pathogen safety of biologicals. *Curr Nanosci*. 2019;16(3):413–24.
<https://doi.org/10.2174/1573413715666190328223130>
9. Филатова ЕВ, Зубкова НВ, Анастасиев ВВ. Выявление генетических и серологических маркеров парвовируса B19 в производственных пулах плазмы для фракционирования. *Биопрепараты*. 2013;(2):28–31.
Filatova EV, Zubkova NV, Anastasiev VV. Identification of genetic and serological markers of parvovirus B19 in the production pools of plasma for fractionation. *Biopreparation (Biopharmaceuticals)*. 2013;(2):28–31 (In Russ.).
EDN: [RDXVEB](https://dx.doi.org/10.26907/2542-1248.2023.2.28-31)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Н.В. Зубкова** – обоснование концепции исследования, разработка дизайна экспериментального исследования,

Установлено, что процесс нанофильтрации не оказывает влияния на биологические и физико-химические характеристики иммуноглобулинов, что подтверждено сравнительными исследованиями препарата до и после нанофильтрации с использованием методов, рекомендуемых Государственной фармакопеей Российской Федерации.

Разработанные в лабораторных условиях параметры нанофильтрации и выход целевого продукта при изучении всех комбинаций исследованных фильтров не менялись при масштабировании в производстве и не приводили к изменениям длительности процесса.

Процесс нанофильтрации можно охарактеризовать как высокопроизводительную стадию при соблюдении оптимальных условий и эффективный инструмент для повышения вирусной безопасности препаратов иммуноглобулинов.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **N.V. Zubkova** substantiated the study concept, designed the experiments, summarised and interpreted the study results,

обобщение и интерпретация результатов исследования, оформление текста рукописи; **А.М. Николаева** — обоснование концепции исследования, сбор, анализ, обобщение и интерпретация результатов исследования, редактирование и переработка текста рукописи; **А.В. Иванов, О.В. Белякова, М.В. Разумихин, Т.И. Смолянова** — координирование этапов исследования, подготовка серий препарата для исследования, сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; **Н.В. Винокурова, И.С. Ефимова** — организация валидационных исследований процесса инактивации патогенных вирусов, сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; **Е.И. Саканян** — организация, координирование этапов исследования, редактирование и переработка текста рукописи.

and formatted the manuscript. **A.M. Nikolaeva** substantiated the study concept, summarised and interpreted the study results, revised and edited the manuscript. **A.V. Ivanov, O.V. Beliakova, T.I. Smolyanova, M.V. Razumikhin** coordinated the study; prepared IgG solution batches for the study; collected, collated, and analysed experimental data. **N.V. Vinokurova, I.S. Efimova** organised validation studies of the process for pathogenic virus inactivation; collected, collated, and analysed experimental data. **E.I. Sakanyan** organised and coordinated the study, revised and edited the manuscript.

Об авторах / Authors

Зубкова Наталия Васильевна, д-р фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5795-4401>
ng-zubkoff@yandex.ru

Николаева Алевтина Максимовна, д-р биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>
nikolaeva.alla@gmail.com

Иванов Александр Викторович, канд. фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-1914>
Ivanoffal@yandex.ru

Белякова Ольга Валерьевна, канд. фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6352-9380>
o.v.beliakova@yandex.ru

Разумихин Михаил Вадимович
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7364-5235>
razumikhin.m@gmail.com

Винокурова Наталья Владимировна
ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-6583-3277>
n.v.vinokurova@microgen.ru

Ефимова Ирина Сергеевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3757-1953>
efimovai@mail.ru

Смолянова Татьяна Ивановна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2934-3002>
tatianasmolyanova@gmail.com

Саканян Елена Ивановна, д-р фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8536-4804>
e.i.sakanjan@microgen.ru

Nataliya V. Zubkova, Dr. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5795-4401>
ng-zubkoff@yandex.ru

Alevtina M. Nikolaeva, Dr. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>
nikolaeva.alla@gmail.com

Alexander V. Ivanov, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-1914>
Ivanoffal@yandex.ru

Olga V. Beliakova, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6352-9380>
o.v.beliakova@yandex.ru

Mikhail V. Razumikhin
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7364-5235>
razumikhin.m@gmail.com

Natalia V. Vinokurova
ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-6583-3277>
n.v.vinokurova@microgen.ru

Irina S. Efimova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3757-1953>
efimovai@mail.ru

Tatiana I. Smolyanova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2934-3002>
tatianasmolyanova@gmail.com

Elena I. Sakanyan, Dr. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8536-4804>
e.i.sakanjan@microgen.ru

Поступила 11.07.2023

После доработки 04.09.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 11 July 2023

Revised 4 September 2023

Accepted 13 September 2023

УДК 615.012.8:615.382

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-411-421>

Научная статья | Scientific article



Сравнительный анализ показателей качества лекарственного препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом

М.В. Томилин[✉], Т.В. Короткова, П.А. Логинов

Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», Филиал в г. Нижний Новгород
«Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов ИмБио»,
ул. Грузинская, д. 44, г. Нижний Новгород, 603950, Российская Федерация

✉ Томилин Михаил Вадимович; m.v.tomilin@microgen.ru

Резюме

Актуальность. Зарубежные лекарственные препараты альбумина человека, зарегистрированные в Российской Федерации, отличаются от отечественных главным образом по составу вспомогательных веществ. Все иностранные препараты альбумина содержат смесь вспомогательных веществ — натрия каприлат и N-ацетил-DL-триптофана; отечественные — только натрия каприлат. Однако стабилизация раствора альбумина натрия каприлатом в высоких концентрациях приводит к ухудшению его лигандсвязывающих свойств. По этой причине, а также для достижения стабильности препаратов при хранении не только при температуре от 2 до 8 °С, но и при комнатной температуре, большинство зарубежных производителей изменили состав препарата альбумина путем снижения содержания натрия каприлата и дополнительного введения N-ацетил-DL-триптофана. В связи с этим актуальным представляется изучение показателей качества разработанного отечественного препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом, содержащим оба указанных компонента.

Цель. Анализ показателей качества препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом в сравнении с зарубежными лекарственными средствами.

Материалы и методы. Активной фармацевтической субстанцией для получения препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом служила плазма крови доноров, соответствующая требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV) ФС.3.3.2.0001.19. Препарат получали методом фракционирования белков плазмы крови. Контроль показателей качества препарата осуществляли в соответствии с требованиями ФС.3.3.2.0006.18. Статистическую обработку проводили с помощью программы Microsoft Excel в соответствии с ОФС.1.1.0013.15.

Результаты. Показано соответствие показателей качества исследуемого препарата установленным требованиям ФС.3.3.2.0006.18. В ходе исследований установлено, что изготовленные серии препарата были прозрачными, термостабильными, стерильными и апиrogenными; имели низкий уровень активатора прекалликреина — менее 1 МЕ/мл; содержание алюминия было в диапазоне от 30,36±10,39 до 50,22±6,94 мкг/л; натрий-иона — от 127,44±10,46 до 145,59±7,32 ммоль/л; калий-иона — менее 0,01 ммоль/г; осмолярность — более 240 мОсм/л. Препарат содержал от 1,79±0,06 до 2,24±0,20% примесей других белков (α- и β-глобулинов); показатель pH был в диапазоне от 6,9 до 7,2; концентрация полимеров и агрегатов не превышала 0,5%.

Выводы. По изученным показателям качества препарат альбумина человека с измененным стабилизирующим составом был сопоставим с зарубежными аналогами и соответствовал требованиям ГФ РФ XIV и Европейской фармакопеи.

Ключевые слова: препарат альбумина человека с измененным стабилизирующим составом; плазма крови; натрия каприлат; N-ацетил-DL-триптофан; показатели качества

© М.В. Томилин, Т.В. Короткова, П.А. Логинов, 2023

Для цитирования: Томилин М.В., Короткова Т.В., Логинов П.А. Сравнительный анализ показателей качества лекарственного препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):411–421. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-411-421>

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

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

Comparative analysis of quality attributes of a human albumin preparation with a modified stabilising composition

Mikhail V. Tomilin ✉, Tatyana V. Korotkova, Petr A. Loginov

Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, Branch in Nizhny Novgorod "Nizhny Novgorod Enterprise for Manufacture of Bacterial Products "ImBio", 44 Gruzinskaya St., Nizhny Novgorod 603950, Russian Federation

✉ Mikhail V. Tomilin; m.v.tomilin@microgen.ru

Abstract

Scientific relevance. The national and international human albumin preparations registered in the Russian Federation mainly differ in their excipient compositions. While all the international preparations of human albumin contain a mixture of sodium caprylate and N-acetyl-DL-tryptophan, the Russian ones contain only sodium caprylate. However, albumin stabilisation with sodium caprylate at high concentrations affects the ligand-binding properties of albumin. For this reason, as well as to achieve storage stability not only at temperatures of 2 °C to 8 °C but also at room temperature, most international manufacturers have reduced the sodium caprylate content in albumin preparations and added N-acetyl-DL-tryptophan. This demonstrates the relevance of studying the quality of a new Russian human albumin preparation with a modified stabilising composition, including both sodium caprylate and N-acetyl-DL-tryptophan.

Aim. The study aimed at comparing several quality attributes of the human albumin preparation with a modified stabilising composition with those of imported human albumin preparations.

Materials and methods. The human albumin preparation with a modified stabilising composition was manufactured by fractionation from donor plasma meeting the requirements of monograph FS.3.3.2.0001.19 of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation edition XIV. The quality control was in line with the monograph on human albumin (FS.3.3.2.0006.18), and statistical analysis was conducted in Microsoft Excel in accordance with the general chapter on statistical analysis (OFS.1.1.0013.15).

Results. The study preparation complied with the requirements specified in monograph FS.3.3.2.0006.18. All the manufactured batches were clear, thermostable, sterile, and non-pyrogenic. The prekallikrein activator levels were low (below 1 IU/mL). The aluminium content varied from 30.36±10.39 µg/L to 50.22±6.94 µg/L. The study preparation contained sodium ions at a concentration from 127.44±10.46 mmol/L to 145.59±7.32 mmol/L and less than 0.01 mmol/g of potassium ions. The osmolarity exceeded 240 mOsm/L. The content of α- and β-globulins ranged from 1.79±0.06% to 2.24±0.20%. The study preparation had a pH level of 6.9 to 7.2. The concentrations of polymers and aggregates did not exceed 0.5%.

Conclusions. The quality attributes studied suggest that the human albumin preparation with a modified stabilising composition is comparable to its international counterparts and that it meets Russian and European pharmacopoeial standards.

Key words: human albumin preparation with a modified stabilising composition; plasma; sodium caprylate; N-acetyl-DL-tryptophan; quality attributes

For citation: Tomilin M.V., Korotkova T.V., Loginov P.A. Comparative analysis of quality attributes of a human albumin preparation with a modified stabilising composition. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3–1):411–421. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-411-421>

Funding. The study was performed without external funding.

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

Введение

Альбумин является одним из наиболее важных белков плазмы крови человека и играет ключевую роль в поддержании коллоидно-осмотического давления крови [1]. Данный белок обладает антиоксидантной активностью, способностью к связыванию свободных радикалов, различных эндогенных и экзогенных веществ, таких как липиды, жирные кислоты, соли желчных кислот, лекарственные вещества и токсичные соединения [2–4]. В молекуле альбумина содержится большое количество реакционноспособных участков (тиоловые, имидазольные, карбоксильные группы, аминокислоты), благодаря чему альбумин легко вступает во взаимодействие с различными ионами, продуктами обмена и лекарственными веществами. Альбумин человека имеет сайты связывания с ионами металлов, например ионами меди и кальция. Таким образом, альбумин является важным регулятором межклеточного транспорта, а также фармакокинетического поведения многих препаратов [1–7]. Все вышеописанные свойства обуславливают широкое терапевтическое применение препаратов человеческого альбумина [8].

В Российской Федерации зарегистрирован ряд препаратов альбумина человека зарубежного производства¹, таких как Плазбумин® («Грифолз Терапьютикс ЛЛС», США), Альбурекс® («СиЭсЭл Беринг АГ», Швейцария), Альбиомин 20% («Биотест Фарма ГмбХ», Германия), Альбуфарм (ООО «Далиомфарма», Республика Беларусь). Принципиальное отличие иностранных препаратов альбумина от отечественных заключается в составе вспомогательных веществ. Все иностранные препараты альбумина человека содержат смесь вспомогательных веществ — натрия каприлата и N-ацетил-DL-триптофана; отечественные — только натрия каприлат.

Исследования, посвященные проблеме стабилизации раствора альбумина, проводятся начиная с периода разработки первого отечественного препарата альбумина человека в 1941 г. [8]. С целью предотвращения полимеризации в процессе пастеризации отечествен-

ные производители в качестве стабилизатора используют натрия каприлат, при этом для получения стабильного препарата к раствору альбумина добавляют его в высоких концентрациях, что приводит к ухудшению его лигандсвязывающих свойств.

Следует отметить, что Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA)² были получены данные о негативном влиянии натрия каприлата в составе препарата при применении альбумина у пациентов с заболеваниями печени, почек и других органов. По этой причине, а также для достижения стабильности препаратов альбумина при хранении при комнатной температуре большинство зарубежных производителей изменили состав препарата альбумина путем снижения содержания натрия каприлата, а также за счет дополнительного введения N-ацетил-DL-триптофана. Такая форма стабилизации препарата альбумина человека с использованием вспомогательных веществ соответствует международным регуляторным требованиям, в частности требованиям Европейской фармакопеи³ и FDA⁴, а также описана в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV) ФС.3.3.2.0006.18⁵.

На предприятии АО «НПО «Микроген» разработан лекарственный препарат альбумина человека с измененным стабилизирующим составом, который включает натрия каприлат и N-ацетил-DL-триптофан.

Цель работы — анализ показателей качества препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом в сравнении с зарубежными лекарственными средствами.

Материалы и методы

Материалы

Исследуемый препарат. Альбумин человека с измененным стабилизирующим составом в виде раствора для инфузий (5, 10, 20%) производства АО «НПО «Микроген» (Россия). Активной фармацевтической субстанцией для получения

¹ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

² Revision of requirements applicable to albumin (human), plasma protein fraction (human), and immune globulin (human). 21 CFR Part 640. Docket No. 98N-0608. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Federal Register. 2000;65(167). <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2000-08-28/pdf/00-21897.pdf>

³ 01/2020:0255 Human albumin solution. European Pharmacopoeia 11th ed., 2022.

⁴ Revision of requirements applicable to albumin (human), plasma protein fraction (human), and immune globulin (human). 21 CFR Part 640. Docket No. 98N-0608. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Federal Register. 2000;65(167). <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2000-08-28/pdf/00-21897.pdf>

⁵ ФС.3.3.2.0006.18 Альбумин человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

препарата служила плазма крови доноров, соответствующая требованиям ФС.3.3.2.0001.19⁶.

Препараты сравнения:

- Альбурекс®, 20% раствор для инфузий производства «СиЭсЭл Беринг АГ» (Швейцария)⁷, серия № P100160449;
- Альбумин человеческий, 20% раствор для инфузий производства «Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес м.б.Х» (Австрия)⁸, серия № P026A6861.

Методы

Для изготовления препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом применяли метод фракционирования белков плазмы крови. На последних стадиях получения препарата осуществляли коррекцию физико-химических показателей, введение стабилизатора N-ацетил-DL-триптофана, пастеризацию, стерилизующую фильтрацию и розлив раствора альбумина.

Контроль показателей качества готового препарата альбумина человека с измененным

стабилизирующим составом и зарубежных аналогов (Альбурекс®, 20% раствор для инфузий, и Альбумин человеческий, 20% раствор для инфузий) осуществляли в соответствии с требованиями ФС.3.3.2.0006.18⁹.

Для анализа препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом использовали методы контроля показателей качества в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV: ОФС.1.8.2.0001.15¹⁰, ОФС.1.8.2.0009.15¹¹, ОФС.1.2.1.0007.15¹², ОФС.1.2.1.1.0003.15¹³, ОФС.1.2.1.0004.15¹⁴, ОФС.1.8.2.0010.18¹⁵, ОФС.1.2.1.2.0005.15¹⁶, ОФС.1.8.2.0013.18¹⁷, ОФС.1.2.1.1.0005.18¹⁸, ОФС.1.2.1.1.0004.15¹⁹, ОФС.1.2.4.0005.15²⁰, ОФС.1.2.4.0004.15²¹, ОФС.1.2.4.0003.15²², ОФС.1.2.1.0003.15²³.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel в соответствии с ОФС.1.1.0013.15²⁴. Исследования проводили в трех независимых испытаниях для каждой из трех серий лекарственного препарата. В таблицах 1 и 2 представлены среднеарифметические значения (*M*) и стандартное отклонение (*SD*).

⁶ ФС.3.3.2.0001.19 Плазма человека для фракционирования. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018 (введена взамен «ФС.3.3.2.0001.18 Плазма человека для фракционирования» приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 185 от 29.03.2019 «Об утверждении общей фармакопейной статьи и фармакопейной статьи»).

⁷ Государственный реестр лекарственных средств. https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=9792a856-c938-4b6d-9ce0-0135037ec343

⁸ Государственный реестр лекарственных средств. https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=f5191c1f-f149-4084-92e8-b30b339444ba

⁹ ФС.3.3.2.0006.18 Альбумин человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

¹⁰ ОФС.1.8.2.0001.15 Иммунодиффузия в геле. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹¹ ОФС.1.8.2.0009.15 Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹² ОФС.1.2.1.0007.15 Прозрачность и степень мутности жидкостей. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹³ ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁴ ОФС.1.2.1.0004.15 Ионметрия. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁵ ОФС.1.8.2.0010.18 Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹⁶ ОФС.1.2.1.2.0005.15 Высокоэффективная жидкостная хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁷ ОФС.1.8.2.0013.18 Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹⁸ ОФС.1.2.1.1.0005.18 Атомно-абсорбционная спектрометрия. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁹ ОФС.1.2.1.1.0004.15 Атомно-эмиссионная спектрометрия. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁰ ОФС.1.2.4.0005.15 Пирогенность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²¹ ОФС.1.2.4.0004.15 Аномальная токсичность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²² ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²³ ОФС.1.2.1.0003.15 Осмолярность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁴ ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Результаты и обсуждение

Были изготовлены по три серии препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом в виде 5, 10 и 20% растворов для инфузий в дозировках 50 и 100 мл, содержащих натрия каприлат и N-ацетил-DL-триптофан в качестве вспомогательных веществ. Проведена оценка соответствия показателей качества требованиям ФС.3.3.2.0006.18²⁵. Результаты анализа представлены в *таблице 1*.

Согласно полученным результатам, основные характеристики препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом были следующие: содержание примесей других белков (α - и β -глобулинов) — от $1,79 \pm 0,06$ до $2,24 \pm 0,20\%$; pH — в диапазоне от 6,9 до 7,2; оптическая плотность растворов в тесте на гемпигменты — не более 0,02; концентрация полимеров и агрегатов — не более 0,5%. Все изготовленные серии исследуемого препарата были прозрачными, термостабильными, стерильными и апиrogenными; характеризовались низким уровнем активатора прекалликреина — менее 1 МЕ/мл; содержание алюминия было в диапазоне от $30,36 \pm 10,39$ до $50,22 \pm 6,94$ мкг/л; содержание натрий-иона — от $127,44 \pm 10,46$ до $145,59 \pm 7,32$ ммоль/л; содержание калий-иона — менее 0,01 ммоль/г; осмолярность — более 240 мОсм/л.

Таким образом, было установлено соответствие показателей качества препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом требованиям ГФ РФ XIV²⁶. Также было продемонстрировано отсутствие отклонений в параметрах, регламентирующих контроль производства при получении коммерческих и экспериментальных серий препарата. Показана высокая степень сопоставимости показателей исследуемого препарата альбумина человека, произведенного до и после внесения изменений в технологию производства. Изменение технологического процесса не повлияло на показатели качества.

В специальной серии экспериментов были проведены исследования сопоставимости показателей качества исследуемого препарата в сравнении с показателями качества зарубежных лекарственных препаратов альбумина человека на примере 20% растворов для инфузий (в дозировке 50 мл). Продemonстрировано, что показатели качества сравниваемых пре-

паратов (*табл. 2*) соответствуют требованиям ГФ РФ XIV²⁷ и Европейской фармакопеи²⁸.

Сравниваемые лекарственные препараты альбумина человека представляли собой прозрачную жидкость желтого цвета, содержали белки, свойственные сыворотке крови человека, и не содержали белки животного происхождения; основной белковый компонент соответствовал альбумину человека. В анализируемых препаратах концентрация белка была в диапазоне от $190,97 \pm 1,25$ до $204,03 \pm 1,55$ г/л; содержание натрия каприлата — от $2,40 \pm 0,01$ до $2,64 \pm 0,11$ г/л, а N-ацетил-DL-триптофана — от $3,59 \pm 0,02$ до $3,95 \pm 0,05$ г/л; оптическая плотность растворов в тесте на гемпигменты/гем не превышала $0,03 \pm 0,01$; показатель pH был в диапазоне от 6,96 до 7,10; содержание полимеров и агрегатов — менее 5,0%. Все серии сравниваемых препаратов альбумина человека были стерильными, нетоксичными и апиrogenными; после прогрева в течение 50 ч при температуре 56 ± 1 °C оставались без изменений; имели низкий уровень активатора прекалликреина — менее 1 МЕ/мл; содержание алюминия было в диапазоне от $13,29 \pm 0,21$ до $39,20 \pm 0,30$ мкг/л; содержание натрий-иона — от $124,24 \pm 7,56$ до $139,12 \pm 0,77$ ммоль/л; содержание калий-иона — менее 0,01 ммоль/г; осмолярность — более 240 мОсм/л.

Таким образом, препарат альбумина человека с измененным стабилизирующим составом был сопоставим с зарубежными препаратами альбумина человека по изученным показателям качества.

Заключение

Все исследованные серии препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом были прозрачными, термостабильными, стерильными и апиrogenными; имели низкий уровень активатора прекалликреина (менее 1 МЕ/мл); содержание натрий-иона было менее 160 ммоль/л; калий-иона — менее 0,01 ммоль/г; осмолярность — более 240 мОсм/л. Содержание примесей других белков (α - и β -глобулинов) в препарате было менее 2,5%; pH — в диапазоне от 6,9 до 7,2; концентрация полимеров и агрегатов не превышала 0,5%.

Разработанная новая биотехнологическая схема позволила получить препарат альбумина с введением дополнительного стабилизатора

²⁵ ФС.3.3.2.0006.18 Альбумин человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

²⁶ Там же.

²⁷ Там же.

²⁸ 01/2020:0255 Human albumin solution. European Pharmacopoeia 11th ed., 2022.

Таблица 1. Показатели качества препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом в виде 5, 10, 20% растворов для инфузий
Table 1. Quality attributes of the human albumin preparation with a modified stabilising composition formulated as 5%, 10%, and 20% solutions for infusion

Наименование показателя <i>Quality attribute</i>	Требования нормативной документации [#] <i>Approved specifications[#]</i>	Значения показателя в препарате альбумина человека, раствор для инфузий* <i>Quality attribute values for human albumin solutions for infusion*</i>					
		5%		10%		20%	
		50 мл <i>50 mL</i>	100 мл <i>100 mL</i>	50 мл <i>50 mL</i>	100 мл <i>100 mL</i>	50 мл <i>50 mL</i>	100 мл <i>100 mL</i>
Прозрачность <i>Clarity</i>	Должен быть прозрачным <i>Must be transparent</i>	Прозрачный <i>Transparent</i>	Прозрачный <i>Transparent</i>	Прозрачный <i>Transparent</i>	Прозрачный <i>Transparent</i>	Прозрачный <i>Transparent</i>	Прозрачный <i>Transparent</i>
Темпигменты, о.е. <i>Haem pigments, a.u.</i>	Оптическая плотность не более 0,15 <i>Absorbance: not more than 0.15</i>	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01
pH	От 6,5 до 7,2 <i>From 6.5 to 7.2</i>	6,93±0,06	7,07±0,12	7,13±0,06	7,15±0,01	7,10±0,01	7,10±0,02
Фракционный состав, % <i>Fractional composition, %</i>	Содержание альбумина – не менее 97; α- и β-глобулинов – не более 3 <i>Albumin: not less than 97; α- and β-globulins: not more than 3</i>	Содержание альбумина <i>Albumin:</i> 97,76±0,20	Содержание альбумина <i>Albumin:</i> 98,06±0,13	Содержание альбумина <i>Albumin:</i> 98,21±0,06	Содержание альбумина <i>Albumin:</i> 97,81±0,25	Содержание альбумина <i>Albumin:</i> 98,05±0,26	Содержание альбумина <i>Albumin:</i> 98,01±0,17
		Содержание α- и β-глобулинов α- and β-globulins: 2,24±0,20	Содержание α- и β-глобулинов α- and β-globulins: 1,94±0,13	Содержание α- и β-глобулинов α- and β-globulins: 1,79±0,06	Содержание α- и β-глобулинов α- and β-globulins: 2,19±0,25	Содержание α- и β-глобулинов α- and β-globulins: 1,95±0,26	Содержание α- и β-глобулинов α- and β-globulins: 1,99±0,17
Белок, г/л <i>Protein, g/L</i>	От 45 до 55 для 5% раствора От 90 до 110 для 10% раствора От 180 до 220 для 20% раствора <i>5% solution: 45–55 10% solution: 90–110 20% solution: 180–220</i>	47,63±0,25	49,33±1,67	99,40±0,87	99,20±0,72	190,97±1,25	190,43±3,79
Полимеры и агрегаты, % <i>Polymers and aggregates, %</i>	Не более 5,0 <i>Not more than 5.0</i>	0,03±0,02	0,04±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,11±0,01	0,11±0,02
Натрия каприлат, г/л <i>Sodium caprylate, g/L</i>	От 0,60 до 0,73 для 5% раствора От 1,20 до 1,46 для 10% раствора От 2,39 до 2,93 для 20% раствора <i>5% solution: 0.60–0.73 10% solution: 1.20–1.46 20% solution: 2.39–2.93</i>	0,66±0,02	0,66±0,03	1,35±0,04	1,27±0,09	2,40±0,01	2,45±0,07

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Наименование показателя Quality attribute	Требования нормативной документации [#] Approved specifications [#]	Значения показателя в препарате альбумина человека, раствор для инфузий* Quality attribute values for human albumin solutions for infusion*					
		5%		10%		20%	
		50 мл 50 mL	100 мл 100 mL	50 мл 50 mL	100 мл 100 mL	50 мл 50 mL	100 мл 100 mL
N-ацетил-DL-триптофан, г/л N-acetyl-DL-tryptophan, g/L	От 0,89 до 1,08 для 5% раствора От 1,77 до 2,17 для 10% раствора От 3,55 до 4,33 для 20% раствора 5% solution: 0.89–1.08 10% solution: 1.77–2.17 20% solution: 3.55–4.33	0,94±0,01	1,02±0,01	1,89±0,01	1,90±0,04	3,59±0,02	3,66±0,07
Активатор прекалликреина, МЕ/мл Prekallikrein activator, IU/mL	Не более 35 Not more than 35	Менее 1 Less than 1	Менее 1 Less than 1	Менее 1 Less than 1	Менее 1 Less than 1	Менее 1 Less than 1	Менее 1 Less than 1
Алюминий, мкг/л Aluminium, µg/L	Не более 200 Not more than 200	50,22±6,94	30,36±10,39	34,32±3,48	43,68±3,58	39,20±0,30	39,70±1,52
Натрий-ион, ммоль/л Sodium ion, mmol/L	От 90 до 160 From 90 to 160	145,59±7,32	127,44±10,46	129,77±5,85	127,93±12,53	127,67±0,67	127,51±0,46
Калий-ион, ммоль/г Potassium ion, mmol/g	Не более 0,05 Not more than 0.05	0,002±0,001	0,0001±0,001	0,003±0,001	0,002±0,001	0,002±0,001	0,001±0,001
Пирогенность Pyrogenicity	Должен быть апиrogenным Must be non-pyrogenic	Апиrogenный Non-pyrogenic	Апиrogenный Non-pyrogenic	Апиrogenный Non-pyrogenic	Апиrogenный Non-pyrogenic	Апиrogenный Non-pyrogenic	Апиrogenный Non-pyrogenic
Стерильность Sterility	Должен быть стерильным Must be sterile	Стерильный Sterile	Стерильный Sterile	Стерильный Sterile	Стерильный Sterile	Стерильный Sterile	Стерильный Sterile
Осмолярность, мОсм/л Osmolarity, mOsm/L	Не менее 240 Not less than 240	247,00±1,73	248,33±0,58	287,33±0,58	288,33±0,58	470,00±2,65	470,00±2,00

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

Примечание. [#] – согласно требованиям Государственной Фармакопей Российской Федерации XIV изд. (ФС.3.3.2.0006.18 Альбумин человека); * – цифровые значения показателя в препарате альбумина человека представлены в виде среднего (*M*) ± стандартного отклонения (*SD*), *n*=9.Note. [#], State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV ed. (FS.3.3.2.0006.18 Human albumin); *, mean (*M*) ± standard deviation (*SD*), *n*=9.

Таблица 2. Показатели качества лекарственных препаратов альбумина человека в виде 20% растворов для инфузий разных производителей
Table 2. Quality attributes of human albumin preparations formulated as 20% solutions for infusion from different manufacturers

Требования нормативной документации*		Требования Европейской фармакопеи [^]		Препарат альбумина человека с измененным стабилизирующим составом**	Альбумин человеческий**	Альбурекс**
Наименование показателя	Значение показателя	Наименование показателя	Значение показателя	Human albumin preparation with a modified stabilising composition**	Human albumin**	Alburex**
Описание	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость желтого, янтарного или зеленоватого цвета <i>Transparent or slightly opalescent liquid of yellow, amber, or greenish colour</i>	Описание	Прозрачная, немного вязкая жидкость; она может быть практически почти бесцветной, желтой, янтарной или зеленой <i>Clear, slightly viscous liquid, almost colourless, yellow, amber, or green</i>	Прозрачная жидкость желтого цвета <i>Clear yellow liquid</i>	Прозрачная жидкость желтого цвета <i>Clear yellow liquid</i>	Прозрачная жидкость желтого цвета <i>Clear yellow liquid</i>
Подлинность Видоспецифичность	Должен содержать белки, свойственные сыворотке крови человека, и не содержать белки животного происхождения <i>Must contain proteins characteristic of human serum and not contain proteins of animal origin</i>	Подлинность	Основной компонент испытуемого препарата должен соответствовать основному компоненту обычной сыворотки крови человека. В препарате могут присутствовать небольшие количества других белков плазмы крови <i>The main component of the preparation to be examined corresponds to the main component of normal human serum. The preparation may show the presence of small quantities of other plasma proteins</i>	Содержит белки, свойственные сыворотке крови человека, и не содержит белки животного происхождения <i>Contains proteins characteristic of human serum and does not contain proteins of animal origin</i>	Содержит белки, свойственные сыворотке крови человека, и не содержит белки животного происхождения <i>Contains proteins characteristic of human serum and does not contain proteins of animal origin</i>	Содержит белки, свойственные сыворотке крови человека, и не содержит белки животного происхождения <i>Contains proteins characteristic of human serum and does not contain proteins of animal origin</i>
Основной белковый компонент	Должен обнаруживаться основной белковый компонент с подвижностью альбумина человека <i>The main protein component with the mobility of human albumin must be detected</i>	Гем	Оптическая плотность не более 0,15 <i>Absorbance: not more than 0.15</i>	Обнаруживается основной белковый компонент с подвижностью альбумина человека <i>The main protein component with the mobility of human albumin is detected</i>	Обнаруживается основной белковый компонент с подвижностью альбумина человека <i>The main protein component with the mobility of human albumin is detected</i>	Обнаруживается основной белковый компонент с подвижностью альбумина человека <i>The main protein component with the mobility of human albumin is detected</i>
Гемпигменты, о.е.	Оптическая плотность не более 0,15 <i>Absorbance: not more than 0.15</i>	Гем	Оптическая плотность не более 0,15 <i>Absorbance: not more than 0.15</i>	0,02±0,01	0,02±0,01	0,03±0,01

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

Требования нормативной документации [#] <i>Approved specifications[#]</i>		Требования Европейской фармакопеи [^] <i>European Pharmacopoeia[^]</i>		Препарат альбумина человеческого с измененным стабилизирующим составом ^{**} <i>Human albumin preparation with a modified stabilising composition^{**}</i>	Альбумин человеческого ^{**} <i>Human albumin^{**}</i>	Альбурекс ^{**} <i>Alburex^{**}</i>
Наименование показателя <i>Quality attribute</i>	Значение показателя <i>Quality attribute value</i>	Наименование показателя <i>Quality attribute</i>	Значение показателя <i>Quality attribute value</i>			
Термостабильность <i>Thermal stability</i>	Препарат после прогрева в течение 50 ч при температуре 56±1 °C должен оставаться без изменений. <i>The medicinal product must remain unchanged after 50 h at a temperature of 56±1 °C</i>	Показатель отсутствует <i>Not standardised</i>	–	После прогрева в течение 50 ч при температуре 56±1 °C остается без изменений <i>Unchanged after 50 h at 56±1 °C</i>	После прогрева в течение 50 ч при температуре 56±1 °C остается без изменений <i>Unchanged after 50 h at 56±1 °C</i>	После прогрева в течение 50 ч при температуре 56±1 °C остается без изменений <i>Unchanged after 50 h at 56±1 °C</i>
pH	От 6,5 до 7,2 <i>From 6.5 to 7.2</i>	pH	От 6,7 до 7,3 <i>From 6.5 to 7.2</i>	7,10±0,01	7,04±0,01	6,96±0,02
Фракционный состав, % <i>Fractional composition, %</i>	Содержание альбумина – не менее 97; α- и β-глобулинов – не более 3 <i>Albumin: not less than 97; α- and β- globulins: not more than 3</i>	Состав белка <i>Protein composition</i>	Не более 5% белка с подвижностью отличной от подвижности основной полосы <i>Not more than 5% of the protein has a mobility different from that of the principal band</i>	Содержание альбумина <i>Albumin: 98,05±0,26</i> Содержание α- и β-глобулинов <i>α- and β- globulins: 1,95±0,26</i>	Содержание альбумина <i>Albumin: 95,31±0,15</i> Содержание α- и β-глобулинов <i>α- and β- globulins: 4,69±0,15</i>	Содержание альбумина <i>Albumin: 92,77±0,26</i> Содержание α- и β-глобулинов <i>α- and β- globulins: 7,23±0,25</i>
Белок, г/л <i>Protein, g/L</i>	От 180 до 220 <i>From 180 to 220</i>	Общий белок <i>Total protein</i>	Не менее 95% и не более 105% количества белка, указанного на этикетке <i>Not less than 95% and not more than 105% of the stated content</i>	190,97±1,25	204,03±1,55	200,00±0,95
Полимеры и агрегаты, % <i>Polymers and aggregates, %</i>	Не более 5,0 <i>Not more than 5.0</i>	Распределение молекул по размеру <i>Molecular size distribution</i>	Полимеры и агрегаты не более 5,0% <i>Polymers and aggregates: not more than 5.0%</i>	0,11±0,01	4,66±0,33	0,07±0,01
Натрия каприлат, г/л <i>Sodium caprylate, g/L</i>	От 2,39 до 2,93 <i>From 2.39 to 2.93</i>	Показатель отсутствует <i>Not standardised</i>	–	2,40±0,01	2,64±0,11	2,58±0,18

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

Требования нормативной документации [#]		Требования Европейской фармакопеи [^]		Препарат альбумина человека с измененным стабилизирующим составом ^{**} <i>Human albumin preparation with a modified stabilising composition^{**}</i>	Альбумин человеческий ^{**} <i>Human albumin^{**}</i>	Альбурекс ^{**} <i>Alburex^{**}</i>
Наименование показателя <i>Quality attribute</i>	Значение показателя <i>Quality attribute value</i>	Наименование показателя <i>Quality attribute</i>	Значение показателя <i>Quality attribute value</i>			
N-ацетил-DL-триптофан, г/л <i>N-acetyl-DL-tryptophan, g/L</i>	От 3,55 до 4,33 <i>From 3.55 to 4.33</i>	Показатель отсутствует <i>Not standardised</i>	–	3,59±0,02	3,95±0,05	3,83±0,02
Активатор прекалликреина, МЕ/мл <i>Prekallikrein activator, IU/mL</i>	Не более 35 <i>Not more than 35</i>	Активатор прекалликреина, МЕ/мл <i>Prekallikrein activator, IU/mL</i>	Не более 35 <i>Not more than 35</i>	Менее 1 <i>Less than 1</i>	Менее 1 <i>Less than 1</i>	Менее 1 <i>Less than 1</i>
Алюминий, мкг/л <i>Aluminium, µg/L</i>	Не более 200 <i>Not more than 200</i>	Алюминий, мкг/л <i>Aluminium, µg/L</i>	Не более 200 <i>Not more than 200</i>	39,20±0,30	13,29±0,21	26,09±3,39
Натрий-ион, ммоль/л <i>Sodium ion, mmol/L</i>	От 90 до 160 <i>From 90 to 160</i>	Натрий, ммоль/л <i>Sodium, mmol/L</i>	Не более 160 <i>Not more than 160</i>	127,67±0,67	139,12±0,77	124,24±7,56
Калий-ион, ммоль/г <i>Potassium ion, mmol/g</i>	Не более 0,05 <i>Not more than 0.05</i>	Калий, ммоль/г <i>Potassium, mmol/g</i>	Не более 0,05 <i>Not more than 0.05</i>	0,002±0,001	0,001±0,001	0,002±0,001
Пирогенность <i>Pyrogenicity</i>	Должен быть апиrogenным <i>Must be non-pyrogenic</i>	Пирогенность <i>Pyrogens</i>	Должен быть апиrogenным <i>Must be non-pyrogenic</i>	Апиrogenный <i>Non-pyrogenic</i>	Апиrogenный <i>Non-pyrogenic</i>	Апиrogenный <i>Non-pyrogenic</i>
Аномальная токсичность <i>Abnormal toxicity</i>	Должен быть нетоксичным <i>Must be non-toxic</i>	Показатель отсутствует <i>Not standardised</i>	–	Нетоксичный <i>Non-toxic</i>	Нетоксичный <i>Non-toxic</i>	Нетоксичный <i>Non-toxic</i>
Стерильность <i>Sterility</i>	Должен быть стерильным <i>Must be sterile</i>	Стерильность <i>Sterility</i>	Должен быть стерильным <i>Must be sterile</i>	Стерильный <i>Sterile</i>	Стерильный <i>Sterile</i>	Стерильный <i>Sterile</i>
Осмолярность, мОсм/л <i>Osmolarity, mOsm/L</i>	Не менее 240 <i>Not less than 240</i>	Показатель отсутствует <i>Not standardised</i>	–	470,00±2,65	278,00±3,53	262,00±4,24

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

Примечание. [#] – согласно требованиям нормативного документа АО «НПО «Микроген» и Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ФС.3.3.2.0006.18 Альбумин человека); [^] – согласно требованиям Европейской фармакопеи 11 изд. (01/2020:0255 Human albumin solution); * – цифровые значения показателей в препаратах альбумина человека представлены в виде среднего (M) ± стандартного отклонения (SD), n=9; «–» – не определялось.

Note. [#], product specification file by Microgen and the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV ed. (FS.3.3.2.0006.18 Human albumin); [^], European Pharmacopoeia, 11th ed. (01/2020:0255 Human albumin solution); *, mean (M) ± standard deviation (SD), n=9; –, not determined.

N-ацетил-DL-триптофана. Изготовленные серии препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом в виде растворов для инфузий (5, 10 и 20%) по изученным показателям качества были сопоставимы со сравниваемыми зарубежными лекарственными препаратами альбумина человека и соответствовали требованиям

Государственной фармакопеи Российской Федерации и Европейской фармакопеи. В разработанном отечественном препарате альбумина человека, содержащем натрия каприлат и N-ацетил-DL-триптофан, обеспечиваются показатели стабильности раствора альбумина при транспортировке и хранении при температуре не выше 25 °C.

Литература/References

1. Gburek J, Konopska B, Gołab K. Renal handling of albumin – from early findings to current concepts. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5809. <https://doi.org/10.3390/ijms22115809>
2. Mishra V, Heath RJ. Structural and biochemical features of human serum albumin essential for eukaryotic cell culture. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8411. <https://doi.org/10.3390/ijms22168411>
3. Тхай СВ, Захаров ВВ, Русанов ВМ. Альбумин – наиболее востребованный препарат крови в трансфузиологической практике. *Вестник службы крови России.* 2012;(3):40–5.
Thai SV, Zakharov VV, Rusanov VM. Albumin is the most demanded blood product in transfusiological practice. *Bulletin of the Blood Service of Russia.* 2012;(3):40–5 (In Russ.).
4. Kragh-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(6):695–704. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.695>
5. Tajmir-Riahi HA. An overview of drug binding to human serum albumin: protein folding and unfolding. *Scientia Iranica.* 2007;14(2):87–95.
6. Boldt J. Use of albumin: an update. *Br J Anaesth.* 2010;104(3):276–84. <https://doi.org/10.1093/bja/aep393>
7. Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol.* 2007;151(5):580–90. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707251>
8. Клигуненко ЕН, Зозуля ОА. Человеческий сывороточный альбумин (прошлое и будущее). *Медицина неотложных состояний.* 2017;(5):26–30.
Kligunenko EN, Zozulya OA. Human serum albumin (the past and the future). *Emergency Medicine.* 2017;(5):26–30 (In Russ.). <https://doi.org/10.22141/2224-0586.5.84.2017.109356>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **М.В. Томилин** – концепция исследования, написание текста рукописи, анализ и интерпретация материалов; формулировка выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **Т.В. Короткова** – анализ и обобщение данных литературы, написание текста рукописи; работа с табличным и иллюстративным материалом; **П.А. Логинов** – критический пересмотр, редактирование и переработка текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **M.V. Tomilin** conceptualised the study, drafted the manuscript, analysed and interpreted the material, formulated the conclusions, and approved the final version of the manuscript for publication. **T.V. Korotkova** analysed and summarised literature data, drafted the manuscript, and prepared the tabular and graphical material. **P.A. Loginov** critically reviewed, edited, and revised the manuscript.

Об авторах / Authors

Томилин Михаил Вадимович, канд. биол. наук
SPIN-код РИНЦ: 1919-3462

m.v.tomilin@microgen.ru

Короткова Татьяна Владимировна, канд. мед. наук
t.v.korotkova@microgen.ru

Логинов Петр Александрович
p.a.loginov@microgen.ru

Mikhail V. Tomilin, Cand. Sci. (Biol.)
SPIN-code: 1919-3462

m.v.tomilin@microgen.ru

Tatyana V. Korotkova, Cand. Sci. (Med.)
t.v.korotkova@microgen.ru

Petr A. Loginov
p.a.loginov@microgen.ru

Поступила 23.06.2023

После доработки 05.09.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 23 June 2023

Revised 5 September 2023

Accepted 13 September 2023



Изучение свойств комплексного биопрепарата с антибактериальной и пробиотической активностью

В.А. Несчисляев, Е.Г. Шилова✉, А.М. Николаева, Е.В. Орлова

Пермское научно-производственное объединение «Биомед», филиал Акционерного общества
«Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам
«Микроген», ул. Братская, д. 177, Пермь, 614089, Российская Федерация

✉ Шилова Екатерина Геннадьевна; eket1981@mail.ru

Резюме

Актуальность. Проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов приобрела глобальное общемировое значение, что определяет необходимость поиска альтернативных антибактериальных средств для лечения инфекционных заболеваний, включая более широкое использование биотехнологических препаратов на основе бактериофагов и пробиотиков, в том числе метаболитного типа. Совокупность бактериотропных (антимикробных и пробиотических) свойств композиций на основе бактериофагов и метаболитов пробиотических бактерий позволяет предполагать наличие качественно нового, сочтанного антибактериального действия, а также эффективность подобных биопрепаратов в отношении антибиотикорезистентных форм микроорганизмов.

Цель. Исследование свойств комплексного биопрепарата с антибактериальной и пробиотической активностью.

Материалы и методы. Разработанный комплексный биопрепарат включает в себя пробиотик на основе экзометаболитов лактобактерий и комплексный бактериофаг. Оценку антимикробной активности комплексного биопрепарата проводили при помощи метода Апфельмана, диско-диффузионного метода в отношении газонных культур — го-мологических комплексному бактериофагу (*Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) и негомолгичных (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*), а также в тесте ингибирования биолюминесценции генномодифицированного индикаторного штамма *Escherichia coli* lum+. Использовали штаммы бактерий, полученные за 2019–2022 гг. из бактериологических лабораторий лечебных учреждений Пермского края (микроорганизмы выделены из различного клинического материала и биотопов). Пробиотическую активность оценивали по стимулирующему действию на модельные микроорганизмы нормофлоры.

Результаты. Комплексный биопрепарат продемонстрировал высокую специфическую антимикробную активность (показатель титра по Апфельману — $10^{-6,6 \pm 0,01}$), которая была сопоставима с показателем бактериофага ($10^{-6,9 \pm 0,01}$), входящего в состав биопрепарата. Исследование диско-диффузионным методом показало, что комплексный биопрепарат обладает более выраженным, чем отдельные его компоненты, антибактериальным действием на все тест-штаммы. Показатель оптической плотности тестовых культур отличался от контрольных значений: для *Lactobacillus plantarum* 8P-A — превышал в 2 раза, для *Bifidobacterium bifidum* 1 — в 1,5 раза, что подтверждает предположение о стимулирующем эффекте комплексного биопрепарата в отношении микроорганизмов нормофлоры. Полученные результаты свидетельствуют о совместимости фагового и пробиотического компонентов комплексного биопрепарата, а также о высоком уровне его антимикробной активности.

Выводы. Разработанный комплексный биопрепарат обладает высокой антимикробной активностью (специфической и неспецифической), проявляющейся в подавлении роста

бактериальных клеток патогенных культур, не ингибируя при этом нормальную микрофлору. Новый комплексный биопрепарат позволит расширить ассортимент препаратов с пробиотическим и антибактериальным действием, в том числе в отношении антибиотикорезистентных форм микроорганизмов.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность; пробиотики метаболитного типа; бактериофаги и пробиотики; бактериотропные свойства; антибактериальное и пробиотическое действие; коррекция дисбиоза; новый комплексный биопрепарат

Для цитирования: Несчислаев В.А., Шилова Е.Г., Николаева А.М., Орлова Е.В. Изучение свойств комплексного биопрепарата с антибактериальной и пробиотической активностью. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):422–430. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-422-430>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

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

Study of a combined biological product with antibacterial and probiotic activity

Valery A. Neschislyaev, Ekaterina G. Shilova✉, Alevtina M. Nikolaeva, Ekaterina V. Orlova

Perm Scientific and Production Association “Biomed”, Branch of the Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, 177 Bratskaya St., Perm 614089, Russian Federation

✉ Ekaterina G. Shilova; eket1981@mail.ru

Abstract

Scientific relevance. The issue of antimicrobial resistance has acquired global significance, urging the search for and use of alternative antibacterial agents to treat infectious diseases. In particular, this situation prompts wider use of biotechnology-derived medicinal products based on bacteriophages and probiotics, including those of the metabolite type. The bacteriotropic (antimicrobial and probiotic) properties of pharmaceutical compositions based on bacteriophages and metabolites of probiotic bacteria suggest a qualitatively new combined antibacterial effect, as well as effectiveness against microorganisms resistant to antibiotics.

Aim. The authors aimed to study the properties of a combined biological product with antibacterial and probiotic effects.

Materials and methods. The study focused on a combined biological product consisting of a probiotic agent based on *Lactobacillus* exometabolites and a complex bacteriophage. The antimicrobial activity evaluation involved the Appelmans method, a disc diffusion method using lawn cultures homologous (*Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., and *Shigella* spp.) and non-homologous (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Yersinia enterocolitica*) to the complex bacteriophage, and a bioluminescence inhibition test using the genetically modified indicator strain *E. coli* lum+. The study used bacterial strains isolated from various clinical samples and biotopes in bacteriological laboratories of healthcare institutions in the Perm Territory in 2019–2022. The probiotic activity was assessed by the stimulating effect on model microorganisms of the normal flora.

Results. The Appelmans method showed that the combined biological product had high antimicrobial activity against microorganisms homologous to the complex bacteriophage. The titres calculated for the combined biological product and its complex bacteriophage component were comparable and amounted to $10^{-6.6 \pm 0.01}$ and $10^{-6.9 \pm 0.01}$, respectively. The disc diffusion method demonstrated that the combined biological product had a more pronounced antibacterial effect on all tested strains than its individual components. The optical density values obtained

with the combined biological product were 1.5 and 2 times higher than the values observed with control samples in *Bifidobacterium bifidum* 1 and *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 cultures, respectively, which demonstrated the stimulating effect of the product on the normal flora. The study results suggest the compatibility of the phage and probiotic components of the combined biological product, as well as its high antimicrobial activity.

Conclusions. The novel combined biological product has high specific and non-specific antimicrobial activity, which consists in the inhibition of pathogenic bacteria growth without affecting the normal flora. The combined biological product broadens the range of medicinal products having probiotic and antibacterial effects, particularly on microorganisms resistant to antibiotics.

Key words: antibiotic resistance; metabolite type probiotics; bacteriophages and probiotics; bacteriotropic properties; antibacterial and probiotic effects; correction of dysbiosis; novel combined biological product

For citation: Neschislyayev V.A., Shilova E.G., Nikolaeva A.M., Orlova E.V. Study of a combined biological product with antibacterial and probiotic activity. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3-1):422–430. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-422-430>

Funding. The study was performed without external funding.

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

Введение

В настоящее время сегмент антибактериальных средств фармацевтического рынка Российской Федерации представлен широким спектром антибиотиков с преобладанием импортных лекарственных препаратов. Однако, несмотря на их разнообразие, российское здравоохранение испытывает большой дефицит в эффективных антимикробных средствах. Связано это в первую очередь с широким распространением антибиотикорезистентности, вызванной бесконтрольным и нерациональным использованием антибиотиков, а также ограничением их применения в медицинской практике из-за множества неблагоприятных побочных эффектов, в том числе дисбиозов различной локализации [1]. Дисбиотические состояния организма, в свою очередь, способствуют нарушению иммунного статуса и, как следствие, развитию заболеваний различной этиологии.

В поиске эффективных средств борьбы с растущей бактериальной резистентностью к антибиотикам вызывает особый интерес терапевтический потенциал композиций на основе бактериофагов и пробиотиков.

Основные достоинства препаратов бактериофагов — высокая терапевтическая эффективность в отношении патогенных микроорганизмов, связанная со специфичностью антимикробного действия. Важно, что при этом такие биопрепараты не оказывают негативного действия на нормальную микрофлору организма и обладают иммуностимулирующими свойствами [2].

В группе пробиотиков в настоящее время наиболее перспективными признаны средства на основе биологически активных экзо- и метаболитов бактерий, имеющие ряд преимуществ по сравнению с традиционными клеточными препаратами. Пробиотики метаболитного типа характеризуются выраженной антагонистической активностью в отношении патогенных микроорганизмов, т. е. способствуют иммуномодулирующему эффекту [3, 4].

С учетом актуальности проблемы был разработан и создан комплексный биопрепарат, сочетающий антибактериальную и пробиотическую активность, для терапии заболеваний, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами.

Цель работы — исследование свойств комплексного биопрепарата с антибактериальной и пробиотической активностью.

Задачи исследования:

- изучить антимикробное действие (специфическое и неспецифическое) комплексного биопрепарата;
- исследовать его пробиотическое воздействие;
- изучить антагонистические свойства комплексного биопрепарата в тесте ингибирования биолюминесценции индикаторного генномодифицированного штамма *Escherichia coli* lum+.

Материалы и методы

Объекты исследования: комплексный биопрепарат с антибактериальной и пробиотической активностью (АО «НПО «Микроген», Россия), а также две его составляющие: экзо- и метаболитный

комплекс культуральной жидкости пробиотической культуры *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 [5, 6], полученный при помощи ультрафильтрации (экспериментальный биопрепарат «Микростим», Пермское НПО «Биомед», филиал АО «НПО «Микроген», Россия), и смесь очищенных стерильных фильтратов фаголизатов различных бактерий (лекарственный препарат, Пермское НПО «Биомед», филиал АО «НПО «Микроген», Россия): *Shigella flexneri* (серовары 1, 2, 3, 4, 6), *Sh. sonnei*, *Salmonella paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. choleraesuis*, *S. oranienburg*, *S. enteritidis*, энтеропатогенной *Escherichia coli* различных серогрупп, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Соотношение экзометаболического комплекса и бактериофага составило 1:9. В работе использовали штаммы бактерий, полученные за период 2019–2022 гг. из бактериологических лабораторий лечебных учреждений Пермского края. Микроорганизмы были выделены из различного клинического материала и биотопов.

Специфическую антимикробную активность оценивали по методу Аппельмана¹ (выражали в отрицательной степени десятичного разведения), а также диско-диффузионным методом² на питательном агаре Мартена в чашке Петри с использованием газонных культур: бактерии, гомологичные бактериофагам, входящим в состав комплексного бактериофага (*Staphylococcus* spp., *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus* spp., *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp.), а также негомологичные (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*).

Газоны бактерий готовили не менее чем с тремя штаммами для каждой культуры. Диски предварительно пропитывали соответствующими образцами комплексного биопрепарата и его компонентов. Диффузия биопрепарата в агар приводила к формированию зоны подавления роста тест-культуры вокруг дисков. Степень антимикробной активности оценивали по диаметру зоны ингибирования роста тест-штамма.

Антагонистическую активность исследуемых препаратов определяли в тесте ингибирования биолюминесценции генномодифицированного индикаторного штамма *E. coli lum+* [7]. К 0,5 мл исследуемого препарата добавляли 0,5 мл бактериальной суспензии тест-штамма и выдерживали при температуре 22±2 °С в течение 24 ч. В качестве контроля использовали бактериальную суспензию индикаторной культуры в стерильном физиологическом растворе; в качестве препарата срав-

нения — нативный экзометаболический комплекс пробиотической культуры *L. plantarum* 8P-A3. Применение данного препарата обусловлено его известным воздействием на индикаторный штамм. Для оценки динамики свечения проводили замеры в течение 14 ч с интервалом в 2 ч при помощи люминометра «Биотокс-10 М» (ООО «НТЦ «Экологическая Перспектива», Россия). Результат выражали количественно — в виде индекса антибактериальной активности (ИАА), численно равного относительному (%) изменению свечения тест-штамма. Это безразмерная величина, рассчитываемая по формуле:

$$\text{ИАА} = \frac{I_k - I_o}{I_o} \times 100, \quad (1)$$

где I_k и I_o — интенсивность свечения контроля и опыта соответственно (при фиксированном времени экспозиции исследуемой пробы с тест-объектом).

Пробиотическую активность комплексного биопрепарата и его составляющих оценивали в отношении модельных микроорганизмов нормофлоры, включая штаммы *Bifidobacterium bifidum* 1 и *L. plantarum* 8P-A3, в эксперименте культивирования клеток. Для определения влияния исследуемых препаратов на рост клеток в 0,5% стерильный раствор глюкозы (24 мл) вносили 3 мл исследуемого образца и такой же объем жидкой культуры лакто- или бифидобактерий, предварительно подготовленной путем регидратации препарата «Лактобактерин сухой» или «Бифидумбактерин сухой» (АО «НПО «Микроген», Россия) в 5 мл 0,9% стерильного раствора натрия хлорида. Полученный комплекс выдерживали в термостате при температуре 37±1 °С в течение 48 ч. В качестве контроля вместо препарата использовали физиологический раствор в аналогичном объеме.

Рост бактериальных культур оценивали по изменению показателя оптической плотности (OD) тестовых культур на спектрофотометре UV-2700 Shimadzu 50061-12 (Япония) в кювете, толщина слоя культуры — 3 мм, длина волны — 540 нм. Уровень стимуляции роста бактериальных культур выражали с помощью коэффициента стимуляции роста (КС роста) по показателям оптической плотности:

$$\text{КС}_{\text{роста}} = \frac{\text{OD}_{\text{О.кон}} - \text{OD}_{\text{О.нач}}}{\text{OD}_{\text{К.кон}} - \text{OD}_{\text{К.нач}}}, \quad (2)$$

где $\text{OD}_{\text{О.кон}}$ — усредненный конечный показатель оптической плотности тестовых культур в опытной пробе; $\text{OD}_{\text{О.нач}}$ — усредненный началь-

¹ ОФС.1.7.1.0002.15 Бактериофаги. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

² МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

ный показатель оптической плотности тестовых культур в опытной пробе; $OD_{K,кон}$ — усредненный конечный показатель оптической плотности тестовых культур в контрольной пробе, $OD_{K,нач}$ — усредненный начальный показатель оптической плотности тестовых культур в контрольной пробе.

Полученные результаты обрабатывали при помощи методов вариационной статистики с использованием программы Microsoft Excel, рассчитывая среднее арифметическое и стандартную ошибку.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе работы исследовали специфическую антимикробную активность комплексного биопрепарата и его составляющих в отношении гомологичных комплексному бактериофагу штаммов методом Аппельмана. Показатель специфической антимикробной активности (среднее значение титра по препарату) исследуемых материалов:

комплексный препарат — $10^{-6,6 \pm 0,01}$;

комплексный бактериофаг — $10^{-6,9 \pm 0,01}$;

экзометаболитный пробиотик — менее $10^{-1,0 \pm 0,00}$.

Выявлено, что показатели специфической активности комплексного биопрепарата и входящего в его состав поликомпонентного бактериофага сопоставимы. Показатель специфической антимикробной активности комплексного биопрепарата по значению титра составил $10^{-6,6 \pm 0,01}$, что свидетельствует о сохранении данной ак-

тивности на высоком уровне, а также, что немаловажно, о совместимости фагового и пробиотического компонентов биопрепарата.

Результаты исследований специфической антимикробной активности диско-диффузионным методом наглядно продемонстрировали, что комплексный биопрепарат обладает более выраженным антибактериальным действием по сравнению с бактериофагом и экзометаболитами пробиотической культуры (табл. 1). Степень антимикробной активности оценивали по диаметру зоны ингибирования роста тест-штамма.

При анализе результатов исследований специфической антимикробной активности диско-диффузионным методом (табл. 1) наиболее высокие показатели выявлены у комплексного препарата. При этом наибольшая зона ингибирования бактериального роста отмечена для клинических штаммов *Shigella* spp. ($19,4 \pm 0,1$ мм), *P. aeruginosa* ($18,9 \pm 0,4$ мм) и *Staphylococcus* spp. ($18,7 \pm 0,1$ мм). При использовании в эксперименте поликомпонентного бактериофага зона ингибирования роста оказалась меньше: для вышеуказанных представителей грамположительных аэробных кокков рода *Salmonella* (группы А–D) — $14,9 \pm 1,5$ мм, для грамотрицательных палочковидных бактерий *Shigella* spp. — $15,8 \pm 1,1$ мм, для представителей *Pseudomonas aeruginosa* — $15,3 \pm 1,5$ мм.

Подтверждено, что важно, влияние комплексного биопрепарата на негомологичные комплексному бактериофагу штаммы: *K. pneumoniae*,

Таблица 1. Специфическое антимикробное действие исследуемого комплексного биопрепарата и его компонентов (диско-диффузионный метод)

Table 1. Specific antimicrobial activity of the combined biological product (disk diffusion method)

Бактериальные тест-культуры <i>Bacterial test cultures</i>	Зона ингибирования роста бактерий, мм <i>Growth inhibition zone, mm</i>		
	Экзометаболитный пробиотик <i>Exometabolite probiotic</i>	Комплексный бактериофаг <i>Complex bacteriophage</i>	Комплексный биопрепарат <i>Combined biological product</i>
<i>Staphylococcus</i> spp.	$6,3 \pm 0,2$	$14,9 \pm 1,0$	$18,7 \pm 0,1$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$6,7 \pm 0,2$	$15,3 \pm 1,5$	$18,9 \pm 0,4$
<i>Escherichia coli</i>	$6,6 \pm 0,2$	$15,1 \pm 1,3$	$18,6 \pm 0,2$
<i>Proteus</i> spp.	$6,5 \pm 0,2$	$15,0 \pm 1,0$	$18,5 \pm 0,3$
<i>Enterococcus</i> spp.	$6,7 \pm 0,2$	$15,2 \pm 1,1$	$18,6 \pm 0,2$
<i>Salmonella</i> (группы А–D / <i>Groups A–D</i>)	$6,3 \pm 0,2$	$14,9 \pm 1,5$	$18,6 \pm 0,2$
<i>Shigella</i> spp.	$6,7 \pm 0,2$	$15,8 \pm 1,1$	$19,4 \pm 0,1$
Среднее значение <i>Mean</i>	$6,6 \pm 0,2$	$15,2 \pm 1,2$	$18,8 \pm 0,2$

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

Таблица 2. Неспецифическое антибактериальное действие комплексного биопрепарата (ингибирование бактериального роста)
Table 2. Non-specific antimicrobial activity of the combined biological product (bacterial growth inhibition)

Бактериальные тест-культуры <i>Bacterial test cultures</i>	Среднее значение зоны ингибирования, мм <i>Mean inhibition zone, mm</i>		
	Экзометаболитный пробиотик <i>Exometabolite probiotic</i>	Комплексный бактериофаг <i>Complex bacteriophage</i>	Комплексный биопрепарат <i>Combined biological product</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,5±0,2	Отсутствие зоны ингибирования <i>No zone of inhibition</i>	7,1±0,2
<i>Yersinia enterocolitica</i>	6,5±0,2		7,1±0,2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6,5±0,2		7,1±0,2
Среднее значение <i>Mean</i>	6,5±0,2		7,1±0,2

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

Таблица 3. Влияние комплексного биопрепарата на накопление биомассы пробиотических культур (тест ингибирования биолюминесценции)
Table 3. Influence of the combined biological product on probiotic biomass accumulation (bioluminescence inhibition assay)

Исследуемый материал <i>Test sample</i>	Изменение оптической плотности (OD, λ=540 нм) <i>Optical density changes (OD, λ=540 nm)</i>			
	<i>Lactobacillus plantarum</i> 8P-A3		<i>Bifidobacterium bifidum</i> 1	
	Опыт/Контроль <i>Test/Control</i>	КС _{роста} <i>SF_{growth}</i>	Опыт/Контроль <i>Test/Control</i>	КС _{роста} <i>SF_{growth}</i>
Комплексный биопрепарат <i>Combined biological product</i>	0,190±0,02 / 0,085±0,02	2,23	0,140±0,02 / 0,093±0,01	1,50
Комплексный бактериофаг <i>Complex bacteriophage</i>	0,102±0,01 / 0,085±0,02	1,20	0,097±0,02 / 0,093±0,01	1,04
Экзометаболитный пробиотик <i>Exometabolite probiotic</i>	0,230±0,02 / 0,085±0,02	2,70	0,182±0,02 / 0,093±0,01	1,95

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

Примечание. КС_{роста} — коэффициент стимуляции роста бактериальных культур (по показателям оптической плотности).
Note. SF_{growth} — bacterial growth stimulation factor (based on optical density values).

Y. enterocolitica и *Acinetobacter baumannii* (табл. 2). Из представленных в таблице 2 данных видно, что комплексный препарат также обладает достоверно более высокой (по сравнению с экзометабитами пробиотической культуры *L. plantarum* 8P-A3) антибактериальной активностью, не связанной со специфичностью комплексного бактериофага.

На следующем этапе работы оценивали влияние комплексного биопрепарата на накопление биомассы (рост) представителей нормофлоры (табл. 3).

Данные по культивированию микроорганизмов нормофлоры (*B. bifidum* 1, *L. plantarum* 8P-A3) показали, что данные бактерии способны к ро-

сту в присутствии всех исследуемых препаратов. Более выраженный рост наблюдался в процессе культивирования бактерий с добавлением в питательную среду экзометаболитов пробиотической культуры *L. plantarum* 8P-A3. В опытах с комплексным бактериофагом оптическая плотность культуры бактерий была значительно ниже. Однако после инкубации культур *L. plantarum* 8P-A3 и *B. bifidum* 1 с добавлением комплексного биопрепарата показатель прироста оптической плотности тестовых культур статистически отличался от контрольных значений и превышал контрольный показатель в 2 раза для *L. plantarum* 8P-A3 и в 1,5 раза для *B. bifidum* 1,

что свидетельствовало о стимулировании роста нормофлоры в этих вариантах опыта.

Вызывает интерес исследование всей совокупности антагонистических свойств, помимо специфических, данного комплексного биопрепарата. Провести экспрессную и количественную оценку данных параметров позволяет тест ингибирования клеточной биолуминесценции (рис. 1) [8].

Исследования антагонистической активности препаратов в отношении модельного тест-штамма энтеробактерий показали, что все образцы обладают значительным ингибированием биолуминесценции *E. coli* lum+. Нативный экзометаболитный комплекс (рис. 1, прямая 4) с первых часов экспозиции максимально подавлял свечение тест-штамма. Образец, разведенный до уровня содержания экзометаболитов в комплексном препарате (рис. 1, кривая 3), стабильно ингибировал свечение *E. coli* lum+ на протяжении всего времени экспозиции: угнетение свечения – 70%.

Комплексный биопрепарат (рис. 1, кривая 1) и комплексный бактериофаг (рис. 1, кривая 2) проявляли схожую динамику ингибирования свечения, которая характеризовалась постепенным увеличением ИАА, максимум которого (угнетение свечения – 99,98 и 99,99%) наблюдали к 8 и 14 ч экспозиции соответственно. О сочетании эффекте комплексного биопрепарата свидетельствовали следующие показатели: более ранний выход на максимальный уровень подавления свечения по сравнению с бактериофагом, а также более выраженное антимикробное

действие по сравнению с разведенным экзометаболитным комплексом.

Комплексный биопрепарат в большей степени угнетал свечение *E. coli* lum+ в первые часы эксперимента, его показатели превосходили практически в 5 раз таковые для комплексного бактериофага, очевидно, за счет экзометаболитной составляющей. Последующее увеличение ИАА комплексного бактериофага обусловлено воздействием специфических фаголизатов энтеробактерий, входящих в состав бактериофага.

Закключение

Анализ результатов показал, что комплексный биопрепарат, включающий в себя пробиотик на основе экзометаболитов лактобактерий и комплексный бактериофаг, обладает высокой антимикробной активностью, проявляющейся в инактивировании бактериальных клеток патогенных культур (подавление их роста), при отсутствии ингибирующего действия в отношении микроорганизмов нормофлоры. Антибактериальное действие комплексного препарата наблюдалось в отношении штаммов бактерий, как гомологичных, так и не гомологичных комплексному бактериофагу, что свидетельствует о его более высоком антибактериальном потенциале.

Разработанный комплексный биопрепарат с сочетанным антибактериальным и пробиотическим действием способен эффективно пополнить пул биотехнологических препаратов, представленных на российском фармацевтическом рынке.

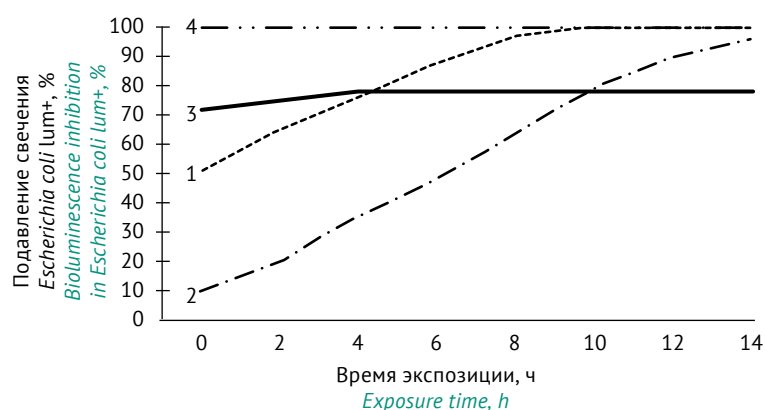


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Неспецифическая антимикробная активность (в тесте ингибирования биолуминесценции индикаторного штамма *Escherichia coli* lum+): 1 — комплексный биопрепарат; 2 — комплексный бактериофаг; 3 — экзометаболиты пробиотической культуры *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (в разведении 1:9); 4 — нативный экзометаболитный комплекс пробиотической культуры *L. plantarum* 8P-A3.

Fig. 1. Non-specific antimicrobial activity (bioluminescence inhibition assay using the indicator strain *Escherichia coli* lum+): 1, combined biological product; 2, complex bacteriophage; 3, exometabolites of the *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 probiotic culture (1:9 dilution); 4, intact exometabolite complex of the *L. plantarum* 8P-A3 probiotic culture.

Литература/References

1. Ефименко ТА, Терехова ЛП, Ефременкова ОВ. Современное состояние проблем антибиотикорезистентности патогенных бактерий. *Антибиотики и химиотерапия*. 2019;64(5–6):64–8. Efimenko TA, Terekhova LP, Efremenkova OV. Current state of the problem of antibiotic resistance of pathogens. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2019;64(5–6):64–8 (In Russ.). EDN: [GJTLZH](#)
2. Назаров ПА. Альтернативы антибиотикам: литические ферменты бактериофагов и фаговая терапия. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2018;(1):5–15. Nazarov PA. Alternatives to antibiotics: phage lytic enzymes and phage therapy. *Bulletin of the Russian State Medical University*. 2018;(1):5–15 (In Russ.). <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.002>
3. Трухманов АС, Румянцева ДЕ. Перспективы применения метабиотиков в комплексной терапии заболеваний кишечника. *Consilium Medicum*. 2020;22(8):51–6. Trukhmanov AS, Rumyantseva DE. Perspective for the use of metabiotics in the complex therapy of intestinal diseases. *Consilium Medicum*. 2020;22(8):51–6 (In Russ.). <https://doi.org/10.26442/20751753.2020.8.200282>
4. Шендеров БА. Метабиотики — новая технология профилактики заболеваний, связанных с микроэкологическим дисбалансом человека. *Вестник восстановительной медицины*. 2017;(4):40–9. Shenderov BA. Metabiotics—novel prophylactic technology of diseases associated with micro-ecological imbalance of human being. *Bulletin of Rehabilitation Medicine*. 2017;(4):40–9 (In Russ.). EDN: [ZFOTLF](#)
5. Несчисляев ВА, Чистохина ЛП. Способ получения биологического стимулятора. Патент Российской Федерации № 2224018; 2004. Neschislyaev VA, Chistokhina LP. Method for preparing a biological stimulating agent. Patent of the Russian Federation No. 2224018; 2004 (In Russ.). EDN: [PEVCZU](#)
6. Шилова ЕГ, Пустобаева МС, Красильникова АН, Хохрякова МД. Методы идентификации карбоновых кислот в составе экзометаболита пробиотической культуры *Lactobacillus plantarum* 8p-a3. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2022;24(6):89–93. Shilova EG, Pustobaeva MS, Krasilnikova AN, Hohryakova MD. Methods of identification of carboxylic acids in the composition of the exometabolite of the probiotic culture *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. *Medical and Pharmaceutical Journal "Pulse"*. 2022;24(6):89–93 (In Russ.). <https://doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-6-89-93>
7. Несчисляев ВА, Пшеничнов РА, Арчакова ЕГ, Чистохина ЛП, Фадеева ИВ. Способ определения антагонистической активности пробиотиков. Патент Российской Федерации № 2187801; 2002. Neschislyaev VA, Pshenichnov RA, Archakova EG, Chistokhina LP, Fadeeva IV. Method of assay of antagonistic activity of probiotics. Patent of the Russian Federation No. 2187801; 2002 (In Russ.). EDN: [QSTGQZ](#)
8. Хохрякова МД, Шилова ЕГ, Несчисляев ВА, Федорова ТВ, Орлова ЕВ, Мокин ПА. Расширение сферы применения теста ингибирования биолуминесценции. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2022;24(4):138–42. Hohryakova MD, Shilova EG, Neschislyaev VA, Fedorova TV, Orlova EV, Mokin PA. Expanding the scope of the bioluminescence inhibition test. *Medical and Pharmaceutical Journal "Pulse"*. 2022;24(4):138–42 (In Russ.). <https://doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-4-138-142>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **В.А. Несчисляев** — создание концепции, обоснование концепции исследования (формулирование идеи, исследовательских целей и задач), организация, координирование этапов исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **Е.Г. Шилова** — проведение экспериментального исследования, разработка дизайна и концепции экспериментального исследования, сбор и систематизация данных, пробоподготовка образцов, проведение инструментальных исследований (исследования бактериотропной активности исследуемых образцов), работа с графическим материалом, анализ и систематизация экспериментальных данных, написание текста рукописи; **А.М. Николаева** — анализ и обобщение результатов исследования, формулировка выводов, критический пересмотр и редактирование текста рукописи, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **Е.В. Орлова** — редактирование и переработка текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **V.A. Neschislyaev** elaborated and substantiated the study concept (formulated the idea, aim, and objectives), organised and coordinated the study, and approved the final version of the manuscript for publication. **E.G. Shilova** designed, conceptualised, and conducted the experimental study; collected and collated data; prepared samples; studied the bacteriotropic activity of the test samples; worked with the graphical material, analysed and collated experimental data; and drafted the manuscript. **A.M. Nikolaeva** analysed and summarised the study results, formulated the conclusions, critically reviewed and edited the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication. **E.V. Orlova** edited and revised the manuscript.

Об авторах / Authors

Несчисляев Валерий Александрович, д-р мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8163-0674>

neschislavew@gmail.ru

Шилова Екатерина Геннадьевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0001-6649>

eket1981@mail.ru

Николаева Алевтина Максимовна, д-р биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>

nikolaeva.alla@gmail.com

Орлова Екатерина Владимировна, д-р фарм. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0401-2546>

e.v.orlova@microgen.ru

Поступила 06.10.2022

После доработки 20.02.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Valery A. Neschislyayev, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8163-0674>

neschislavew@gmail.ru

Ekaterina G. Shilova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0001-6649>

eket1981@mail.ru

Alevtina M. Nikolaeva, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>

nikolaeva.alla@gmail.com

Ekaterina V. Orlova, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0401-2546>

e.v.orlova@microgen.ru

Received 6 October 2022

Revised 20 February 2023

Accepted 13 September 2023



Исследование пробиотической активности метаболитов бактерий *Bacillus subtilis* при экспериментальном дисбиозе у мышей

С.А. Лазарев[✉], Н.О. Вартанова, А.В. Поддубиков, Н.А. Михайлова

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

✉ Лазарев Сергей Александрович; lazarevsr1@gmail.com

Резюме

Актуальность. Перспективные средства для коррекции дисбиоза — метабиотики, препараты на основе метаболитов пробиотических микроорганизмов. В опытах *in vitro* бактерии *Bacillus subtilis* (штаммы 3Н и 1719) в процессе культивирования синтезируют метаболиты, обладающие пробиотическими свойствами. Представляет интерес исследование влияния данных метаболитов *in vivo* на мукозную микробиоту толстого кишечника в условиях экспериментального дисбиоза (у мышей) и оценка возможности их применения в качестве метабиотиков в медицине.

Цель. Изучить пробиотическую активность метаболитов бактерий *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 в сравнении с показателями коммерческого метабиотика при антибиотик-ассоциированном дисбиозе у мышей.

Материалы и методы. Работа проводилась на мышах линии BALB/c, массой 18–20 г. Экспериментальный дисбиоз моделировали при помощи внутрибрюшинного введения гентамицина. Для коррекции развившихся нарушений животным опытных групп в течение 21 сут интрагастрально вводили метаболиты штаммов *B. subtilis*, иммобилизованные на сорбенте, а в группе сравнения — коммерческий метабиотик, содержащий метаболиты штамма *B. subtilis* ВКПМ № В-2335(3)3. Мукозную микробиоту толстого кишечника мышей качественно и количественно оценивали посредством бактериологического метода. Выросшие колонии микроорганизмов идентифицировали при помощи масс-спектрометрии MALDI-TOF.

Результаты. Экспериментальный антибиотик-ассоциированный дисбиоз толстого кишечника мышей проявился в снижении количества доминантной микробиоты и росте условно-патогенных микроорганизмов. Введение исследуемых метаболитов в течение 7 сут привело во всех опытных группах к нормализации содержания бактерий *Lactobacillus*; наилучшие показатели выявлены у животных, которым вводили штамм *B. subtilis* 3Н, видовой состав лактобацилл соответствовал интактным мышам. Восстановление содержания лактозопозитивной кишечной палочки (*E. coli* lac+) достигло 100%. После 21 сут применения метаболитов *B. subtilis* 3Н зафиксирована элиминация бактерий *Rodentibacter* spp., *Aerococcus* spp., грибов *Trichosporon* spp., *Kazachstania* spp. Метаболиты штамма *B. subtilis* 1719 способствовали элиминации грибов *Trichosporon* spp., однако не влияли на количество *Kazachstania* spp. При введении коммерческого метабиотика выявлена элиминация *Enterococcus* spp., *Kazachstania* spp. и *Trichosporon* spp., при этом не отмечено воздействия на *Rodentibacter* spp. и *Aerococcus* spp.

Выводы. Метаболиты штаммов *B. subtilis* 3Н и 1719 способствовали восстановлению качественного и количественного состава микробиоценоза толстого кишечника в условиях антибиотик-ассоциированного дисбиоза у мышей. Выявленные различия в процессах нормализации микробиоценоза в разных группах животных указывают на вариативность специфической активности бактерий *B. subtilis*.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis* 3H, *Bacillus subtilis* 1719; метаболиты *B. subtilis*; антибиотик-ассоциированный дисбиоз; коррекция дисбиоза; дисбиоз кишечника; метабитики; мукозная микробиота

Для цитирования: Лазарев С.А., Вартанова Н.О., Поддубиков А.В., Михайлова Н.А. Исследование пробиотической активности метаболитов бактерий *Bacillus subtilis* при экспериментальном дисбиозе у мышей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):431–442. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-445>

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021) с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова».

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

Probiotic activity of *Bacillus subtilis* metabolites in experimentally induced dysbiosis in mice

Sergei A. Lazarev✉, Nune O. Vartanova, Alexander V. Poddubikov,
Natalia A. Mikhailova

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

✉ Sergei A. Lazarev; lazarevsr1@gmail.com

Abstract

Scientific relevance. A promising option for dysbiosis correction is the use of metabiotics, products based on metabolites of probiotic microorganisms. During fermentation, *Bacillus subtilis* bacteria (strains 3H and 1719) produce metabolites that exhibit probiotic properties *in vitro*. These observations *in vitro* motivate an *in vivo* investigation of *B. subtilis* metabolite effects on colonic mucosal microbiota in mice in experimentally induced dysbiosis and an assessment of the potential of *B. subtilis* metabolites as metabiotics.

Aim. The authors aimed to compare the probiotic activity of *B. subtilis* 3H and *B. subtilis* 1719 metabolites and a commercial metabiotic in antibiotic-induced dysbiosis in mice.

Materials and methods. The authors induced experimental dysbiosis in BALB/c mice weighing 18–20 g by intraperitoneal injection of gentamicin. For subsequent correction, the test groups received sorbent-bound *B. subtilis* metabolites, and the comparison group received a commercial metabiotic containing *B. subtilis* metabolites (VKPM B-2335(3)3) via intragastric injection for 21 days. The quantitative and qualitative analysis of colonic mucosal microbiota included microbial culturing and colony identification by MALDI-TOF mass spectrometry.

Results. Antibiotic-induced colonic dysbiosis in mice manifested itself as a decrease in the dominant microbiota and an increase in opportunistic pathogens. After 7 days of metabolite administration, the *Lactobacillus* population returned to normal in all treatment groups. The mice that received *B. subtilis* 3H metabolites showed the best results: their *Lactobacillus* spp. composition corresponded to that of intact animals. The content of Lac+ *Escherichia coli* returned to 100% in all treatment groups. After 21 days of metabolite administration, the authors observed the elimination of bacteria (*Rodentibacter* spp., *Aerococcus* spp.) and fungi (*Trichosporon* spp., *Kazachstania* spp.) in the *B. subtilis* 3H group; *Trichosporon* spp. (no effect on *Kazachstania* spp.) in the *B. subtilis* 1719 group; and *Enterococcus* spp., *Kazachstania* spp., and *Trichosporon* spp. (no effect on *Rodentibacter* spp. and *Aerococcus* spp.) in the commercial metabiotic group.

Conclusions. Metabolites of *B. subtilis* strains 3H and 1719 help to restore the diversity and abundance of colonic microbiota in antibiotic-induced dysbiosis. The differences observed in microbiota re-establishment in the treatment groups indicate that there is interstrain variability in the probiotic activity of *B. subtilis* metabolites.

Key words: *Bacillus subtilis* 3H; *Bacillus subtilis* 1719; *B. subtilis* metabolites; antibiotic-induced dysbiosis; dysbiosis correction; intestinal dysbiosis; metabiotics; mucosal microbiota

For citation: Lazarev S.A., Vartanova N.O., Poddubikov A.V., Mikhailova N.A. Probiotic activity of *Bacillus subtilis* metabolites in experimentally induced dysbiosis in mice. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3–1):431–442. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-445>

Funding. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of Russia (Agreement No. 075-15-2021-676 of 28 July 2021), using the equipment of the Research Equipment Sharing Center of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia.

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

Введение

Организм человека и его микробиота — единая экологическая система, которая находится в состоянии динамического равновесия. Нормальная (индигенная) микробиота выполняет разнообразные жизненно важные функции, в том числе обеспечивает колонизационную резистентность, принимает участие в метаболических процессах, синтезе иммуноглобулинов и в морфогенезе иммунной системы [1–3]. Качественные и количественные нарушения нормального микробного состава биотопов организма (дисбиоз) — предрасполагающие факторы развития широкого спектра заболеваний [4]. Особенный интерес представляет дисбиоз толстого кишечника с его сложным, разнообразным и метаболически активным микробиомом, оказывающим глобальное воздействие на здоровье. Причиной дисбиоза может быть воздействие на организм различных факторов эндогенного и экзогенного характера: возраста, образа жизни, характера питания, инфекционных заболеваний, приема лекарственных препаратов, окружающей среды и др. [5–8].

В настоящее время становятся все более востребованными метабиотики (постбиотики) — препараты для коррекции дисбиотических нарушений, содержащие не живые клетки, а продукты жизнедеятельности пробиотических микроорганизмов. В отличие от классических пробиотиков метабиотики имеют более длительный период сохранности, четкие мишени приложения, их легче дозировать и контролировать, они лучше абсорбируются, распределяются по организму, тканям и органам, быстрее и в большей степени элиминируются из организма [2, 9–11].

Пробиотические штаммы бактерий рода *Bacillus* продуцируют большое количество биологически активных низкомолекулярных соединений, полезных для человека; считаются вторыми (после *Lactobacillus*) по масштабам продуцентами антибиотических веществ, отличающихся широким антимикробным спектром и подавляющих рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Род *Bacillus* также

характеризуется высокой биохимической активностью, положительным влиянием на иммунную систему и индигенную микробиоту [12–14]. В настоящее время препараты на основе живых бацилл находят широкое и разнообразное применение, в том числе в качестве пробиотиков в медицине. Метаболиты пробиотических штаммов бацилл — перспективные компоненты для создания метабиотиков.

В настоящее время в клинической практике применяется коммерческий метабиотик (КМ) Бактистатин®, созданный на основе продуктов жизнедеятельности бактерии *Bacillus subtilis* ВКПМ № В-2335(3)3 [15]. Однако его биологическая активность ограничивается свойствами одного штамма-продуцента. С учетом того что спектр веществ, продуцируемых бактериями *B. subtilis*, штаммоспецифичен, изучение функциональных свойств метаболитов других штаммов позволит расширить номенклатуру препаратов для эффективной терапии дисбиотических нарушений.

Штамм *B. subtilis* 3Н (ГИСК № 248), полученный в результате селекции *B. subtilis* 534 на устойчивость к антибиотику рифампицину, обладает антагонистическими свойствами в отношении возбудителей заболеваний желудочно-кишечного тракта человека и применяется в клинической практике в качестве пробиотика [16].

Штамм бактерий *B. subtilis* 1719 (ГИСК № 277), выделенный в естественных условиях, обладает широким спектром антагонистической активности, иммуномодулирующей активностью, продуцирует комплекс гидролитических ферментов [17].

Ранее установлено, что при глубинном периодическом культивировании *in vitro* штаммы *Bacillus subtilis* 3Н и 1719 продуцируют внеклеточные метаболиты, обладающие противомикробными свойствами в отношении условно-патогенных микроорганизмов [18]. Представляется важным изучение пробиотической активности метаболитов данных штаммов *in vivo*.

Цель работы — изучить пробиотическую активность метаболитов бактерий *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 в сравнении с показателями коммерческого метабиотика при антибиотик-ассоциированном дисбиозе у мышей.

Задачи исследования:

- смоделировать экспериментальный антибиотик-ассоциированный дисбиоз у мышей;
- провести сравнительную оценку пробиотического эффекта метаболитов исследуемых штаммов *B. subtilis* и коммерческого варианта *B. subtilis* ВКПМ № В-2335(3)З.

Материалы и методы

Работу проводили на мышах линии BALB/c массой 18–20 г. Животных содержали в идентичных условиях (температура, относительная влажность, освещение и рацион питания) в виварии в соответствии с ГОСТ 33216-2014¹. Исследование с использованием лабораторных животных одобрено локальным советом по этике при ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 13.07.2022).

Для приготовления экспериментальных препаратов выполняли глубинное периодическое культивирование штаммов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 на ранее подобранной питательной среде, оптимальной для цели исследования [18]. Полученную биомассу отделяли от среды центрифугированием с последующей микрофилтрацией. В качестве иммобилизующей матрицы использовали цеолит Холинского месторождения (НПО «Новь», Новосибирск, Россия) [15].

Экспериментальных животных разделили на пять групп. Группа 1 (контрольная) состояла из интактных мышей. В группу 2 входили животные, у которых моделировали антибиотик-ассоциированный дисбиоз путем внутрибрюшинного введения в течение 5 сут раствора гентамицина в концентрации 80 мкг/мл, в пересчете на массу тела животного [19]. Мышам групп 3 и 4 по окончании введения антибиотика интрагастрально вводили препараты на основе метаболитов штаммов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 соответственно. В группе 5 после формирования дисбиоза мыши интрагастрально получали КМ, содержащий метаболиты штамма *B. subtilis* ВКПМ № В-2335(3)З.

Коррекцию микробиоты проводили в течение 21 сут. Животных выводили из эксперимента на 1, 7, 14, 21-е сутки после окончания курса гентамицина декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением принципов Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных или в иных научных целях².

Микробиологические исследования пристеночного муцина проводили согласно методике, предложенной Л.И. Кафарской и Н.А. Коршуновым [20]. Освобожденные от химуса биоптаты слизистой оболочки толстого кишечника взвешивали в асептических условиях, помещали в стерильный фосфатный буфер (соотношение 1:10) и выдерживали в течение 2 ч для разжижения муцина. По 0,1 мл каждого приготовленного 10-кратного разведения (10^{-3} – 10^{-5}) материала взвеси засекали газом на поверхность питательных сред, инкубировали 1–2 сут при температуре +37°C в аэробных и анаэробных условиях.

Использовались следующие питательные среды (№ 1–4 производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Россия (ФБУН ГНЦ ПМБ):

- питательная среда № 10 ГРМ (для выделения *Staphylococcus aureus*) с добавлением яичного желтка;
- агар Эндо-ГРМ, питательная среда для выделения *Enterobacteriales*;
- Лактобакагар, питательная среда для выделения и культивирования *Lactobacillus*;
- питательная среда № 2 ГРМ (Сабуро) для выращивания и подсчета грибов;
- ГРМ-агар, питательный агар для культивирования микроорганизмов, с добавлением 5% стерильной дефибрированной лошадиной крови (ЗАО «ЭКОлаб», Россия);
- UriSelect 4, хромогенный агар для выделения уropatогенных бактерий (Bio-Rad, Франция);
- Bifidobacterium Agar, для выделения бифидобактерий (HiMedia, Индия);
- Schaedler Agar, для выделения строгих или факультативных анаэробных бактерий (HiMedia, Индия).

Для выделения бифидобактерий дополнительно проводили посев 30 мкл из разведений исходного материала в пробирки с 3 мл полужидкой печеночно-цистеиновой среды Блаурокка (ФБУН ГНЦ ПМБ).

Чистые культуры микроорганизмов идентифицировали при помощи матрично-активированной лазерной десорбционно/ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (далее — MALDI-TOF MS, от matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry)

¹ ГОСТ 33216–2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. <https://docs.cntd.ru/document/1200127506>

² ETS 123. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (с изменениями на 15.06.2006). <https://docs.cntd.ru/document/901909691>

на приборе MALDI Biotyper sirius RUO System (Bruker, США).

Удельное содержание выделенных из биопроб жизнеспособных микроорганизмов выражали в lg КОЕ/г массы биологического материала [21]. Статистическую обработку данных проводили после проверки нормальности распределения при помощи программы Microsoft Excel с использованием параметрических критериев. Результаты представили в виде среднего арифметического с ошибкой репрезентативности ($M \pm m$). Достоверность различий средних величин вычисляли по *t*-критерию Стьюдента. Значения $p \leq 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

На протяжении эксперимента ни в одной из групп животных не наблюдали гибели, неожиданных изменений в потреблении пищи или в другом поведении, не зафиксировали статистически значимых различий по массе животных. Основные микроорганизмы, которые выделяли из биопроб мышей, идентифицировали по родам и сравнивали по их содержанию исследуемые группы. При изучении мукозной микрофлоры толстого кишечника контрольных (интактных) мышей на всех этапах эксперимента идентифицированы бактерии *Lactobacillus* (*L. gasseri*, *L. murinus*, *L. reuteri*, *L. intestinalis*) (рис. 1), *Escherichia coli* (lac+), *Enterococcus* (*E. gallinarum gallinarum*, *E. faecalis*), *Rodentibacter* (*R. pneumotropicus*, *R. heylii*), *Streptococcus* (*S. hyointestinalis*, *S. suis*), а также грибы *Kazachstania* (*K. pintolopesii*, *K. telluris*).

Введение гентамицина ожидаемо привело к уменьшению и (или) исчезновению бактериальной микрофлоры (табл. 1). У мышей группы 2 (дисбиоз) отмечали отсутствие роста бактерий *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Rodentibacter*,

Streptococcus, увеличение содержания грибов *Kazachstania* (*K. pintolopesii*, *K. telluris*) примерно в 1,5 раза по отношению к показателям контрольных животных, а также появление грибов *Trichosporon* (*T. asahii*). Не выявили достоверных различий между группами по общему содержанию кишечной палочки, при этом в группе 2 отмечали снижение содержания лактозопозитивной кишечной палочки (*E. coli* lac+) от 100 до 75%, а также появление и рост лактозонегативных вариантов (lac-) – от 0 до 25%. Гемолитические *E. coli* не обнаружили. В единичных случаях фиксировали рост бактерий *Cytobacillus oceanisediminis* (4 lg КОЕ/г), *Staphylococcus warneri* (7 lg КОЕ/г), *Stenotrophomonas maltophilia* (5 lg КОЕ/г).

После моделирования дисбиоза в группах 3–5 вводили с целью коррекции состава микробиоты исследуемые метаболиты бактерий *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719, а также коммерческий препарат-метабиотик с метаболитами *B. subtilis*. Мышей группы 2 (дисбиоз) использовали для отрицательного контроля.

Через 7 сут после окончания введения гентамицина (табл. 2) у животных группы 2 отметили отсутствие бактерий *Lactobacillus*, *Rodentibacter*, *Streptococcus*. Содержание *Enterococcus* и грибов *Kazachstania* увеличилось в 1,3 и 1,5 раза соответственно. Выделены отсутствующие у интактных животных бактерии *E. coli* lac- (20%), *Aerococcus* (*A. viridans*) и грибы *Trichosporon* (*T. asahii*). В единичных случаях наблюдали рост *R. pneumotropicus* ($4,5 \pm 0,5$ lg КОЕ/г).

Применение метабиотиков в течение 7 сут способствовало нормализации содержания лактобацилл, при этом по видовому разнообразию *Lactobacillus* группы различались между собой (рис. 2).

У мышей группы 3 (*B. subtilis* 3Н) выделено четыре вида лактобацилл: *L. gasseri*, *L. murinus*, *L. reuteri*, *L. intestinalis*; у представителей группы 4

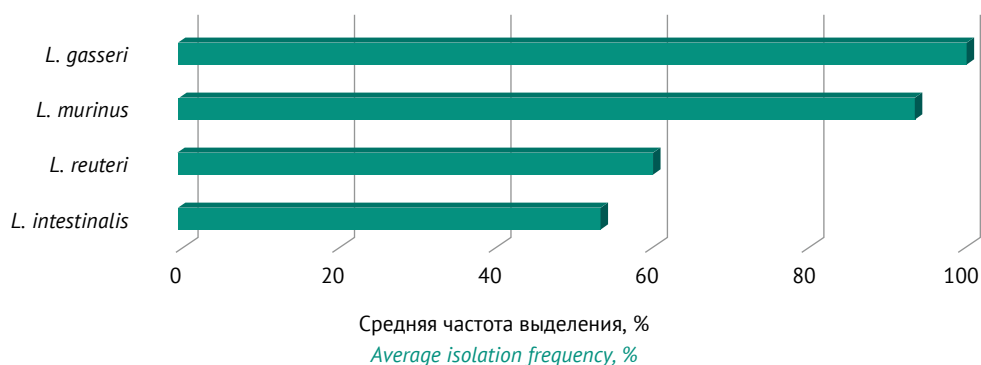


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Средняя частота выделения *Lactobacillus* spp. в контрольной группе (интактные мыши) на всех этапах эксперимента.

Fig. 1. Average frequency of *Lactobacillus* spp. isolation in the control group (intact mice) at all stages of the experiment.

Таблица 1. Качественный и количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей в условиях экспериментального дисбиоза**Table 1.** Qualitative and quantitative composition of colonic mucosal microbiota in mice under experimental dysbiosis conditions

Выделенные микроорганизмы <i>Isolated microorganisms</i>	Содержание в разведениях 10^{-3} – 10^{-5} , lg КОЕ/г ($M \pm m$), в группе <i>Content in 10^{-3}–10^{-5} dilutions, log₁₀ CFU/g ($M \pm m$), by group</i>	
	1 (контроль, интактные мыши) <i>1 (control, intact mice)</i>	2 (дисбиоз) <i>2 (dysbiosis)</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,25±0,32	—
<i>E. coli</i> : lac+/lac–, %	5,67±0,88 100/0	4,75±0,48 75/25*
<i>Enterococcus</i> spp.	4,33±0,33	—
<i>Rodentibacter</i> spp.	5,25±0,25	—
<i>Streptococcus</i> spp.	6,00±0,41	—
<i>Aerococcus</i> spp.	—	—
<i>Kazachstania</i> spp.	4,33±0,33	6,20±0,58*
<i>Trichosporon</i> spp.	—	5,25±0,48*

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

Примечание. «—» — отсутствие роста. * $p \leq 0,05$ (по сравнению с контрольной группой).Note. —, no growth. * $p \leq 0.05$ (compared with the control group).**Таблица 2.** Качественный и количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей после 7-дневной коррекции дисбиоза**Table 2.** Qualitative and quantitative composition of colonic mucosal microbiota in mice after 7 days of dysbiosis correction

Выделенные микроорганизмы <i>Isolated microorganisms</i>	Содержание в разведениях 10^{-3} – 10^{-5} , lg КОЕ/г ($M \pm m$), в группе <i>Content in 10^{-3}–10^{-5} dilutions, log₁₀ CFU/g ($M \pm m$), by group</i>				
	1 (контрольная, интактные мыши) <i>1 (control, intact mice)</i>	2 (дисбиоз) <i>2 (dysbiosis)</i>	3 (<i>B. subtilis</i> 3H) <i>3 (B. subtilis 3H)</i>	4 (<i>B. subtilis</i> 1719) <i>4 (B. subtilis 1719)</i>	5 (КМ) <i>5 (CM)</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,50±0,34	—	6,71±0,52**	5,80±0,47**	6,11±0,31**
<i>E. coli</i> : lac+/lac–, %	5,67±0,33 100/0	5,67±0,88 80/20*	5,67±0,33 100/0**	4,33±0,33 100/0**	5,00±0,58 100/0**
<i>Enterococcus</i> spp.	5,00±0,58	6,50±0,29*	5,00±0,40**	4,75±0,48**	—
<i>Rodentibacter</i> spp.	4,25±0,25	—	—	—	4,67±0,33**
<i>Streptococcus</i> spp.	5,25±0,48	—	4,67±0,33**	5,40±0,24**	5,50±0,65**
<i>Aerococcus</i> spp.	—	5,00±0,58*	4,33±0,33	5,00±0,40	5,00±0,58
<i>Kazachstania</i> spp.	4,25±0,25	6,67±0,33*	4,67±0,66**	5,67±0,33**	4,25±0,25**
<i>Trichosporon</i> spp.	—	4,67±0,33*	—	—	4,33±0,33

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

Примечание. «—» — отсутствие роста; КМ — коммерческий метабитик (Бактистатин®). * $p \leq 0,05$ (по сравнению с контрольной группой); ** $p \leq 0,05$ (по сравнению с группой 2 (дисбиоз)).Note. —, no growth; CM, commercial metabiotic (Bactistatin®). * $p \leq 0.05$ (compared with the control group); ** $p \leq 0.05$ (compared with group 2 (dysbiosis)).

(*B. subtilis* 1719) и 5 (КМ) идентифицировали только два вида: *L. gasseri*, *L. murinus*.

Применение метабитиков в течение 7 сут приводило во всех опытных группах к восстановлению содержания кишечной палочки и исчезновению вариантов lac–. От животных, по-

лучавших метабитики (группы 3–5), выделяли стрептококки (*S. hyointestinalis*), отсутствующие у мышей группы 2, а также бактерии *A. viridans* — без достоверных различий по их содержанию. У животных в группах 3 и 4 фиксировали снижение общего содержания *Enterococcus* и гри-

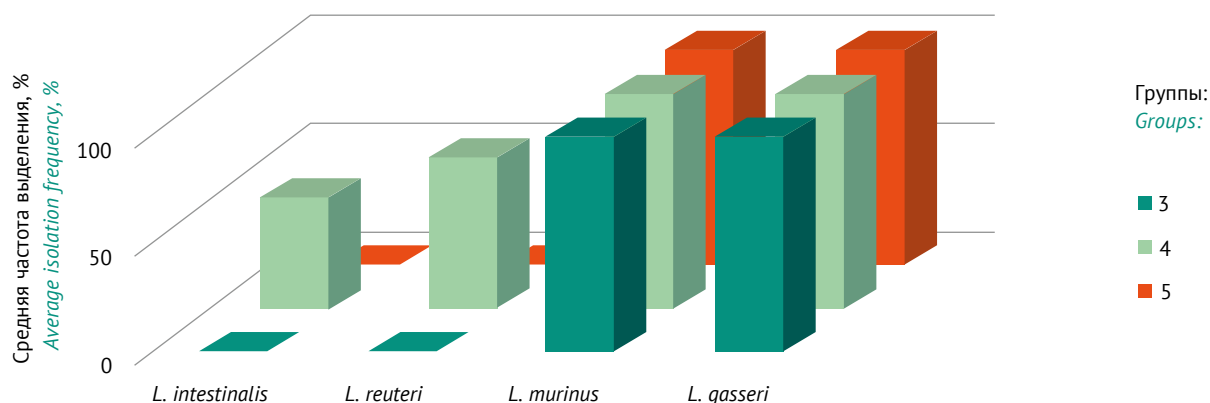


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Средняя частота выделения *Lactobacillus* spp. после 7-дневной коррекции дисбиоза у мышей.

Fig. 2. Average frequency of *Lactobacillus* spp. isolation after 7 days of dysbiosis correction in mice.

Таблица 3. Качественный и количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей после 14-дневной коррекции дисбиоза

Table 3. Qualitative and quantitative composition of colonic mucosal microbiota in mice after 14 days of dysbiosis correction

Выделенные микроорганизмы <i>Isolated microorganisms</i>	Содержание в разведениях 10^{-3} – 10^{-5} , lg КОЕ/г ($M \pm m$), в группе <i>Content in 10^{-3}–10^{-5} dilutions, log₁₀ CFU/g ($M \pm m$), by group</i>				
	1 (контрольная, интактные мыши) <i>1 (control, intact mice)</i>	2 (дисбиоз) <i>2 (dysbiosis)</i>	3 (<i>B. subtilis</i> 3H) <i>3 (B. subtilis 3H)</i>	4 (<i>B. subtilis</i> 1719) <i>4 (B. subtilis 1719)</i>	5 (КМ) <i>5 (CM)</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,60±0,40	—	6,27±0,33**	6,17±0,48**	6,60±0,24**
<i>E. coli</i> lac+/lac–, %	5,67±0,88 100/0	6,33±0,33 80/20*	4,33±0,33** 100/0	4,33±0,33** 100/0	4,67±0,33** 100/0
<i>Enterococcus</i> spp.	4,25±0,25	6,40±0,24*	4,75±0,48**	4,67±0,67**	—
<i>Rodentibacter</i> spp.	5,25±0,48	—	—	—	5,25±0,63**
<i>Streptococcus</i> spp.	4,75±0,48	—	5,00±0,40**	5,67±0,88**	4,75±0,48**
<i>Aerococcus</i> spp.	—	5,00±0,57*	—	4,33±0,33	4,67±0,67
<i>Kazachstania</i> spp.	4,25±0,25	6,20±0,58*	—	4,75±0,25**	—
<i>Trichosporon</i> spp.	—	4,33±0,33*	—	—	—

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

Примечание. «—» — отсутствие роста; КМ — коммерческий метабиотик (Бактистатин®). * $p \leq 0,05$ (по сравнению с контрольной группой); ** $p \leq 0,05$ (по сравнению с группой 2 (дисбиоз)).

Note. —, no growth; CM, commercial metabiotic (Bactistatin®). * $p \leq 0.05$ (compared with the control group); ** $p \leq 0.05$ (compared with group 2 (dysbiosis)).

бов *Kazachstania* примерно в 1,3 раза, а также отсутствие грибов *T. asahii*. В группе 5 отмечали элиминацию *Enterococcus*, снижение количества грибов *Kazachstania* в 1,6 раза, но появление бактерий *Rodentibacter* и наличие грибов *T. asahii*.

После 14-дневного приема метабиотиков тенденция к нормализации микробиоты продолжалась во всех опытных группах (табл. 3). В биопробах мышей из групп 3–5 содержание и видовой состав лактобацилл соответствовали показателям контрольных животных (рис. 1). Частота

обнаружения *E. coli* lac+ составила 100%. Отсутствовал рост дрожжей *T. asahii*. В группах 3 и 5 зафиксировали элиминацию грибов *Kazachstania*; в группе 4 содержание этих грибов оказалось ниже в 1,3 раза по сравнению с показателями в группе 2. В биопробах мышей группы 3 отмечено отсутствие роста *A. viridans*.

У представителей группы 2, не получавших метабиотики, микробный пейзаж не изменился по сравнению с предыдущими сроками наблюдения в этой же группе. Однако в единичных

Таблица 4. Качественный и количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей после коррекции дисбиоза в течение 21 сут**Table 4.** Qualitative and quantitative composition of colonic mucosal microbiota in mice after 21 days of dysbiosis correction

Выделенные микроорганизмы <i>Isolated microorganisms</i>	Содержание в разведениях 10^{-3} – 10^{-5} , lg КОЕ/г ($M \pm m$), в группе <i>Content in 10^{-3}–10^{-5} dilutions, log₁₀ CFU/g ($M \pm m$), by group</i>				
	1 (контрольная, интактные мыши) <i>1 (control, intact mice)</i>	2 (дисбиоз) <i>2 (dysbiosis)</i>	3 (<i>B. subtilis</i> 3H) <i>3 (B. subtilis 3H)</i>	4 (<i>B. subtilis</i> 1719) <i>4 (B. subtilis 1719)</i>	5 (KM) <i>5 (CM)</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,17±0,48	4,50±0,50*	6,70±0,37**	6,00±0,40**	6,38±0,62**
<i>E. coli</i> : lac+/lac–, %	4,75±0,48 100/0	5,67±0,88 90/10	4,67±0,33 100/0	4,33±0,33 100/0	4,75±0,25 100/0
<i>Enterococcus</i> spp.	4,25±0,25	5,25±0,48*	4,40±0,24**	4,33±0,33**	—
<i>Rodentibacter</i> spp.	4,25±0,25	—	—	—	4,33±0,33**
<i>Streptococcus</i> spp.	5,25±0,48	—	4,25±0,25**	5,00±0,58**	6,80±0,20**
<i>Aerococcus</i> spp.	—	4,50±0,29*	—	—	4,67±0,33
<i>Kazachstania</i> spp.	4,33±0,33	5,17±0,30*	—	4,75±0,25	—
<i>Trichosporon</i> spp.	—	4,33±0,33*	—	—	—

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

Примечание. «—» — отсутствие роста; KM — коммерческий метабитик (Бактистатин®). * $p \leq 0,05$ (по сравнению с контрольной группой); ** $p \leq 0,05$ (по сравнению с группой 2 (дисбиоз)).Note. —, no growth; CM, commercial metabiotic (Bactistatin®). * $p \leq 0.05$ (compared with the control group); ** $p \leq 0.05$ (compared with group 2 (dysbiosis)).

случаях в составе мукозной микробиоты зафиксирован рост *L. gasseri* ($4,5 \pm 0,5$ lg КОЕ/г).

На 21-й день после окончания курса гентамицина (табл. 4) выявили следующие изменения. В группе 2 наблюдалась тенденция к восстановлению доминантной флоры. У мышей обнаружены лактобациллы, представленные одним видом: *L. gasseri*. Частота выделения *E. coli* lac– составила 10%. В группах 3 и 5 изменений не отмечено. У животных группы 4 рост бактерий *A. viridans* не зафиксирован.

При исследовании биопроб муцинового слоя толстого кишечника на разных этапах во всех группах показано, что рост бактерий рода *Bifidobacterium*, представляющих доминантную флору толстого кишечника, отсутствовал. Однако в пробирках с дифференциально-диагностической средой Блаурокка после 24–48 ч инкубации биопроб визуально обнаруживали «типичные» колонии бифидобактерий. Тем не менее морфологическое изучение выросших микроорганизмов и масс-спектрометрия MALDI-TOF не подтвердили наличие *Bifidobacterium*. В работе Н. Qiao с соавт. [22] представлены схожие результаты: бифидобактерии не высевались из биоматериала большинства экспериментальных групп и лишь изредка выявлялись в био-

пробах мышей, получавших лечение препаратами бифидобактерий, наличие *Bifidobacterium* подтверждалось и другими методами. Можно предположить, что бактериологический метод не подходит для выделения бифидобактерий из муцинового слоя толстого кишечника.

Результаты свидетельствуют, что метабитики *B. subtilis* нормализуют микробиоценоз толстого кишечника в случае антибиотик-ассоциированного дисбиоза. Так, нормализовалось содержание лактобацилл, а также состав (варианты lac– и lac+) *E. coli*, снизилось количество условно-патогенной флоры.

Выявлены различия в показателях между животными, получавшими метабитики. Лучшие результаты по восстановлению содержания лактобактерий обеспечили метаболиты штамма *B. subtilis* 3H, о чем свидетельствуют содержание и разнообразие видов лактобацилл после 7-дневной коррекции дисбиоза (рис. 2), а также нормализация содержания кишечной палочки с исчезновением вариантов lac–. Толстый кишечник интактных мышей колонизировали бактерии *Rodentibacter* (*R. pneumotropis*, *R. heylii*), вызывающие оппортунистические инфекции у грызунов. Применение гентамицина привело к исчезновению вышеуказанных микроорганиз-

мов во всех опытных группах. При коррекции дисбиоза метаболитами штаммов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 отсутствовали в мукозной микрофлоре *Rodentibacter*, однако у животных из группы КМ их количество вновь возрастало до уровня показателей интактных мышей. В отношении *Enterococcus* (*E. gallinarum*, *E. faecalis*) большей эффективностью отличался КМ: данные бактерии полностью отсутствовали в микробиоте толстого кишечника. Коррекция дисбиоза исследуемыми метаболитами приводила к снижению количества энтерококков до уровня показателей контрольных животных. Условно-патогенные бактерии *A. viridans*, появившиеся в микробиоте мышей после моделирования дисбиоза, элиминировали при введении метаболитов в следующие сроки: *B. subtilis* 3Н – в течение 14 сут коррекции; *B. subtilis* 1719 – после 21 сут применения. У животных, получавших КМ, количество *Aerococcus* spp. не изменялось.

Грибы рода *Kazachstania* (*K. pintolopesii*, *K. telluris*), вызывающие инфекции у лабораторных мышей, обнаружены в микробиоте толстого кишечника контрольной группы. Введение гентамицина способствовало росту содержания этих грибов в 1,5 раза. Применение метаболитов *B. subtilis* 3Н и КМ привело к элиминации данного вида дрожжей в течение 14 сут коррекции. Метаболиты *B. subtilis* 1719 обладали слабой активностью по отношению к *Kazachstania*, при этом содержание данных грибов снижалось до уровня показателей интактных мышей. Грибы рода *Trichosporon* (*T. asahii*) обнаруживались в биопробах мышей после моделирования дисбиоза; лечение метаболитами как *B. subtilis* 3Н, так и *B. subtilis* 1719 в течение 7 сут приводило к элиминации указанных грибов. У животных из группы КМ грибы *Trichosporon* spp. исчезли из состава микробиоты после 14 сут коррекции дисбиоза.

Обобщенные результаты исследования *B. subtilis* 3Н. Отмечен ряд позитивных процессов, которые были инициированы действием метаболитов *B. subtilis* 3Н:

- 1) после 7-дневной коррекции дисбиоза:
 - восстановление видового разнообразия и более быстрая нормализация содержания бактерий *Lactobacillus* spp. ($6,71 \pm 0,52$ lg КОЕ/г) по сравнению с метаболитами других штаммов;
 - восстановление количественного и качественного состава кишечной палочки (*E. coli* lac+ 100%);
 - элиминация бактерий *Rodentibacter* spp. и грибов *Trichosporon* spp.;
 - нормализация содержания *Enterococcus* spp. ($5,0 \pm 0,4$ lg КОЕ/г);

2) через 14 сут коррекции дисбиоза: элиминация *Aerococcus* spp. и *Kazachstania* spp.

При этом метаболиты *B. subtilis* 3Н не влияли на содержание *Streptococcus* spp. ($4,75 \pm 0,25$ lg КОЕ/г) в течение 21-дневного применения.

Обобщенные результаты исследования *B. subtilis* 1719. Зафиксированы положительные изменения на фоне воздействия метаболитов штамма *B. subtilis* 1719:

- 1) после 7-дневной коррекции дисбиоза:
 - нормализация содержания бактерий *Lactobacillus* spp. ($5,8 \pm 0,47$ lg КОЕ/г);
 - нормализация количественного и качественного состава кишечной палочки (*E. coli* lac+ 100%);
 - элиминация грибов *Trichosporon* spp.;
 - нормализация содержания *Enterococcus* spp. ($4,75 \pm 0,48$ lg КОЕ/г);

2) через 21 день коррекции дисбиоза: исчезновение *Aerococcus* spp.

Метаболиты штамма *B. subtilis* 1719 не оказывали влияния на содержание *Streptococcus* spp. ($5,0 \pm 0,58$ lg КОЕ/г) и *Kazachstania* spp. ($4,75 \pm 0,25$ lg КОЕ/г).

Обобщенные результаты исследования коммерческого метабактериоцида. Отмечено положительное воздействие препарата, содержащего метаболиты *B. subtilis* (штамм ВКПМ № В-2335(3)3), на микробиоценоз толстого кишечника:

- 1) после 7-дневного применения:
 - нормализация содержания бактерий *Lactobacillus* spp. ($5,8 \pm 0,47$ lg КОЕ/г) и кишечной палочки (*E. coli* lac+ 100%);
 - элиминация *Enterococcus* spp.;

2) через 14 сут коррекции дисбиоза: исчезновение грибов *Kazachstania* spp. и *Trichosporon* spp.

Коммерческий метабактериоцид в течение 21-дневного применения не влиял на содержание в мукозной микробиоте бактерий *Rodentibacter* spp. ($4,33 \pm 0,33$ lg КОЕ/г), *Streptococcus* spp. ($6,80 \pm 0,20$ lg КОЕ/г) и *Aerococcus* spp. ($4,67 \pm 0,33$ lg КОЕ/г).

Заключение

Установлено, что метаболиты пробиотических штаммов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 положительно влияют на микробиоценоз толстого кишечника в ходе коррекции после смоделированного антибиотик-ассоциированного дисбиоза у мышей линии BALB/c. Однако биологическая активность коммерческого метабактериоцида ограничивается свойствами одного штамма-продуцента *B. subtilis*, следовательно, изучение метаболитов других штаммов *B. subtilis*, а тем более в комплексе, позволит расширить номенклатуру применяемых

препаратов и спектр комплексного воздействия при дисбиозе.

Можно предположить, что выявленные различия в процессах нормализации микробиоты толстого кишечника мышей связаны с индивидуальными особенностями штаммов *B. subtilis*, используемых в работе.

Литература/References

1. Бухарин ОВ, Перунова НБ. Роль микробиоты в регуляции гомеостаза организма человека при инфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(5):458–67. Bukharin OV, Perunova NB. The role of microbiota in the regulation of homeostasis in the human body during infection. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(5):458–67 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-8>
2. Shenderov BA, Sinita AV, Zakharchenko MM, Lang C. *Metabiotics: Present state, challenges and perspectives*. Springer International Publishing; 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-34167-1>
3. Михайлова НА, Воеводин ДА, Лазарев СА. Современные представления о про-/эукариотических взаимодействиях организма человека – основа создания нового поколения пробиотических препаратов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(4):346–55. Mikhailova NA, Voevodin DA, Lazarev SA. A modern view of pro-/eukaryote interactions in the human body as the basis for development of next-generation probiotics. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(4):346–55 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-7>
4. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
5. Kato I, Sun J. Microbiome and diet in colon cancer development and treatment. *Cancer J*. 2023;29(2):89–97. <https://doi.org/10.1097/PP0.0000000000000649>
6. Несвижский ЮВ. Изучение изменчивости кишечного микробиоценоза человека в норме и патологии. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2003;(1):49–54. Nesvizhskiy YuV. Study of changes in the human intestinal micro-biocenosis in health and in disease. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2003;(1):49–54 (In Russ.). EDN: [OHAQDI](https://doi.org/10.29296/25877305-2019-12-21)
7. Успенский ЮП, Барышник НВ. Дисбиоз кишечника и антибиотик-ассоциированная диарея в условиях стационара: профилактика и коррекция. *Врач*. 2019;(12):81–85. Uspensky YuP, Baryshnikova NV. Intestinal dysbiosis and antibiotic-associated diarrhea in a hospital setting: prevention and correction. *Vrach*. 2019;(12):81–5 (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/25877305-2019-12-21>
8. Weiss GA, Hennet T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(16):2959–77. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>
9. Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W. Postbiotics – a step beyond pre- and probiotics. *Nutrients*. 2020;12(8):2189. <https://doi.org/10.3390/nu12082189>
10. Шендеров БА, Ткаченко ЕИ, Лазебник ЛБ, Ардатская МД, Синица АВ, Захарченко ММ. Метабиотики – новая технология профилактики и лечения заболеваний, связанных с микрoэкологическими нарушениями в организме человека. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2018;151(3):83–92. Shenderov BA, Tkachenko EI, Lazebnik LB, Ardat-skaya MD, Sinita AV, Zakharchenko MM. Metabiotics – novel technology of protective and treatment of diseases associated with microecological imbalance in human being. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2018;151(3):83–92 (In Russ.).
11. Олескин АВ, Шендеров БА. Пробиотики, психобиотики и метабиотики: проблемы и перспективы. *Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация*. 2020;2(3):233–43. Oleskin AV, Shenderov BA. Probiotics, psychobiotics, and metabiotics: problems and prospects. *Physical and Rehabilitation Medicine, Medical Rehabilitation*. 2020;2(3):233–43 (In Russ.). <https://doi.org/10.36425/rehab25811>
12. Забокрицкий НА. Биологически активные вещества, синтезируемые пробиотическими микроорганизмами родов *Bacillus* и *Lactobacillus*. *Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке»*. 2015;17(3):80–90. Zabokritskiy NA. The biologically active substances produced probiotic microorganisms of the genera *Bacillus* and *Lactobacillus*. *The Journal of scientific articles "Health and Education Millennium"*. 2015;17(3):80–90 (In Russ.).
13. Ilinskaya ON, Ulyanova VV, Yarullina DR, Gataullin IG. Secretome of intestinal bacilli: a natural guard against pathologies. *Front Microbiol*. 2017;(8):1666. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01666>
14. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol*. 2005;56(4):845–57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
15. Волков МЮ, Васильев ПГ, Воробейчиков ЕВ, Синица АВ, Рогожин АЗ, Котельников РВ. Препарат для лечения заболеваний желудочно-кишечного

- тракта «Бактистатин». Патент Российской Федерации № 2287335;2006.
Volkov MYu, Vasilev PG, Vorobejchikov EV, Sinita AV, Rogozhin AZ, Kotelnikov RV. Preparation "Bactistatin" for treating diseases of gastrointestinal tract. Patent of the Russian Federation No. 2287335;2006 (In Russ.).
EDN: [OUOWIH](#)
16. Михайлова НА, Кузнецова ТН, Кунягина ОВ. Штамм бактерий *Bacillus subtilis*, несущий свойство антибиотикорезистентности, используемый для получения препарата «Бактиспорин». Патент Российской Федерации № 2067616;1996.
Mikhaylova NA, Kuznetsova TN, Kunyagina OV. Strain of bacteria *Bacillus subtilis* carrying property antibioticoresistance used for preparation "Bactisporin" making. Patent of the Russian Federation No. 2067616;1996 (In Russ.).
EDN: [ZALBXX](#)
17. Михайлова НА, Гатауллин АГ. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 — продуцент антагонистически активной биомассы в отношении болезнетворных микроорганизмов, а также протеолитических, амилитических и липолитических ферментов. Патент Российской Федерации № 2298032;2007.
Mikhailova NA, Gataullin AG. *Bacillus subtilis* 1719 bacterium strain as producer of antagonistically active biomass in relates to pathogenic microorganisms, as well as proteolytic, amylolytic, and lipolytic enzymes. Patent of the Russian Federation No. 2298032;2007 (In Russ.).
EDN: [TPVIMS](#)
18. Лазарев СА, Арзуманян ВГ, Михайлова НА. Влияние состава питательной среды на прирост биомассы и синтез противомикробных метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis*. *Бактериология*. 2021;6(2):38–42.
Lazarev SA, Arzumanyan VG, Mikhailova NA. Influence of nutrient medium composition on biomass growth and antimicrobial metabolites synthesis of *Bacillus subtilis* probiotic strains. *Bacteriology*. 2021;6(2):38–42 (In Russ.).
EDN: [KGFVMJ](#)
19. Авдеева ЮА, Калущий ПВ, Королев ВА, Медведева ОА, Вережкина НА, Калущий АП. Коррекция последствий окислительного стресса в условиях экспериментального дисбиоза с применением мексидола. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2017;(4):43–7.
Avdeeva YA, Kalucki PV, Korolev VA, Medvedeva OA, Verevskina NA, Kalucki AP. Use of mexidol for correction effects of oxidative stress in experimental dysbiosis. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2017;(4):43–7 (In Russ.).
EDN: [ZVEWCF](#)
20. Ефимов БА, Кафарская ЛИ, Коршунов ВМ. Современные методы оценки качественных и количественных показателей микрофлоры кишечника и влагалища. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2002;(4):72–8.
Efimov BA, Kafarskaia LI, Korshunov VM. Modern methods for the evaluation of qualitative and quantitative changes in the characteristics of intestinal and vaginal microflora. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2002;(4):72–8 (In Russ.).
EDN: [MPKMLJ](#)
21. Несвижский ЮВ, Богданова ЕА, Зверев ВВ, Воробьев АА. Микробиоценоз пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта крыс с индуцированным дисбиозом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007;(3):57–60.
Nesvizhsky YuV, Bogdanova EA, Zverev VV, Vorobyev AA. Microbiocenosis of parietal mucin in gastrointestinal tract of rats with induced dysbiosis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2007;(3):57–60 (In Russ.).
EDN: [HFNMCE](#)
22. Qiao H, Duffy LC, Griffiths E, Dryja D, Leavens A, Rossman J, et al. Immune responses in rhesus rotavirus-challenged BALB/c mice treated with bifidobacteria and prebiotic supplements. *Pediatr Res*. 2002;51(6):750–5.
<https://doi.org/10.1203/00006450-200206000-00015>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **С.А. Лазарев** — разработка дизайна и концепции экспериментального исследования (формулирование идеи, исследовательских целей и задач); сбор, анализ, интерпретация результатов; анализ и обобщение данных литературы; применение статистических методов для анализа данных; написание, редактирование, оформление текста рукописи, работа с графическим материалом; **Н.О. Вартанова** — сбор исследовательских данных; сбор, анализ, интерпретация результатов; **А.В. Поддубиков, Н.А. Михайлова** — разработка дизайна и концепции экспериментального исследования (формулирование идеи, исследовательских целей и задач), критический пересмотр содержания текста; 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. **S.A. Lazarev** designed and conceptualised the research (idea, aim, and objectives); collected, analysed, and interpreted the results; analysed and consolidated literature data; carried out the statistical analysis; drafted, edited, and formatted the manuscript; worked with the graphical material. **N.O. Vartanova** accumulated research data; collected, analysed, and interpreted the results. **A.V. Poddubikov** designed and conceptualised the research (idea, aim, and objectives); critically revised the manuscript; approved the final version for publication. **N.A. Mikhailova** designed and conceptualised the research (idea, aim, and objectives); critically revised the manuscript; approved the final version for publication.

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).

Исследование с использованием лабораторных животных одобрено локальным советом по этике при ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 13.07.2022).

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021) с использованием научного оборудования ЦКП ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

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 22.09.2010 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 study was approved by the Local Ethics Council at the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Approval No. 6 of 13.07.2022).

Acknowledgements. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of Russia (Agreement No. 075-15-2021-676 of 28 July 2021), using the equipment of the Research Equipment Sharing Center of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia.

Об авторах / Authors

Лазарев Сергей Александрович

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3206-6015>
lazarevsr1@gmail.com

Вартанова Нунэ Оганесовна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6372-9910>
labmicr@mail.ru

Поддубиков Александр Владимирович,

канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>
poddubikov@yandex.ru

Михайлова Наталья Александровна, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6652-2093>
n_mikhailova@inbox.ru

Sergei A. Lazarev

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3206-6015>
lazarevsr1@gmail.com

Nune O. Vartanova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6372-9910>
labmicr@mail.ru

Alexander V. Poddubikov, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>
poddubikov@yandex.ru

Natalia A. Mikhailova, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6652-2093>
n_mikhailova@inbox.ru

Поступила 13.07.2022

После доработки 04.07.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Online first 25.09.2023

Received 13 July 2022

Revised 4 July 2023

Accepted 13 September 2023

Online first 25 September 2023



Особенности разработки, аттестации и применения фармакопейного стандартного образца содержания иммуноглобулинов класса А в препаратах иммуноглобулинов человека для парентерального применения

А.В. Нечаев^{1✉}, Э.Ю. Кудашева¹, Е.Л. Постнова¹, Р.А. Волкова¹, О.В. Фадейкина¹,
И.В. Борисевич², А.А. Мовсисянц¹

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

² Федеральное медико-биологическое агентство, Волоколамское ш., д. 30, Москва, 123182, Российская Федерация

✉ Нечаев Алексей Викторович; Nechaev@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Оценку содержания примеси иммуноглобулинов класса А (IgA) в парентеральных лекарственных формах препаратов иммуноглобулинов человека необходимо проводить в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием стандартного образца. Международный стандартный образец (МСО) содержания IgA аттестован с использованием весового метода и метода радиальной иммунодиффузии. В настоящее время стандартный образец содержания IgA в препаратах иммуноглобулинов человека, аттестованный с использованием трех фармакопейных методов, отсутствует, что не позволяет сопоставить результаты, полученные разными методами, и может стать причиной некорректной оценки содержания нежелательной примеси IgA.

Цель. Определить порядок разработки, аттестации и применения фармакопейного стандартного образца (ФСО) содержания IgA в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

Материалы и методы. Исследуемые образцы кандидата в ФСО содержания IgA изготавливали с использованием субстанции «Плазма человека для фракционирования». Определение содержания IgA проводили методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и ИФА с использованием коммерчески доступных наборов реагентов и МСО. Определение содержания примеси IgA проводили в образцах коммерчески доступных препаратов иммуноглобулинов человека различных производителей. Использовали методы описательной статистики и дисперсионного анализа с применением программ Microsoft Excel и Statistica 10.0.

Результаты. Разработан ФСО с аттестованной характеристикой содержания IgA: 1,98 мг/мл (расширенная неопределенность 0,44 мг/мл; коэффициент охвата $k=2$; уровень доверия 95%) — для количественного определения содержания примеси IgA в препаратах иммуноглобулинов человека методами радиальной иммунодиффузии и ИФА; от 1,31 до 2,64 мг/мл (расширенная неопределенность 0,67 мг/мл; коэффициент охвата $k=3$; уровень доверия 99%) — для внутрилабораторного контроля качества аналитических работ по оценке содержания примеси IgA методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и ИФА.

Выводы. Разработанный ФСО содержания IgA включен в реестр ФСО ГФ РФ под названием «Стандартный образец содержания иммуноглобулинов класса А (IgA)» (реестровый номер ФСО 3.1.00454) и предназначен для стандартизации методов оценки содержания примеси IgA в парентеральных лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

Ключевые слова: препараты иммуноглобулинов человека; фармакопейный стандартный образец (ФСО); иммуноглобулины класса А; примесь IgA; аттестация; кинетическая нефелометрия; радиальная иммунодиффузия; иммуноферментный анализ

Для цитирования: Нечаев А.В., Кудашева Э.Ю., Постнова Е.Л., Волкова Р.А., Фадейкина О.В., Борисевич И.В., Мовсесянц А.А. Особенности разработки, аттестации и применения фармакопейного стандартного образца содержания иммуноглобулинов класса А в препаратах иммуноглобулинов человека для парентерального применения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):443–451. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-443-451>

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. И.В. Борисевич (с 2012 г.) и А.А. Мовсесянц (с 2001 г.) являются членами редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Development, certification, and use of a pharmacopoeial standard for the content of immunoglobulin A in human immunoglobulins for parenteral administration

Alexey V. Nechaev¹✉, Elvira Yu. Kudasheva¹, Evgeniya L. Postnova¹,
Rauza A. Volkova¹, Olga V. Fadeikina¹, Igor V. Borisevich², Artashes A. Movsesyants¹

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

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

✉ Alexey V. Nechaev; Nechaev@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. The immunoglobulin A (IgA) impurity content in parenteral human immunoglobulins should be determined in accordance with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation by kinetic nephelometry, radial immunodiffusion, or enzyme immunoassay (ELISA) with a reference standard. The International Standard (IS) for the content of IgA is certified using gravimetry and radial immunodiffusion. However, neither of the existing standards for the content of IgA in human immunoglobulins is currently certified using all three compendial methods. This prevents analysts from comparing test results obtained by different methods and may lead to an underestimation of the IgA content in human immunoglobulins.

Aim. This study aimed to determine the procedure for the development, certification, and use of a pharmacopoeial reference standard (RS) for the content of IgA in human immunoglobulins.

Materials and methods. The authors studied candidate RSs for the IgA content derived from human plasma for fractionation. The IgA content determination involved kinetic nephelometry, radial immunodiffusion, and ELISA, as well as commercial test kits and the IS. The authors quantified the IgA impurity in samples of commercial human immunoglobulins from various manufacturers. The data analysis involved descriptive statistics and variance analysis using Microsoft Excel and Statistica 10.

Results. The authors established a pharmacopoeial standard with a certified IgA content of 1.98 mg/mL (expanded uncertainty, 0.44 mg/mL; coverage coefficient, $k=2$; confidence level, 95%) for IgA impurity quantification in human immunoglobulins by radial immunodiffusion and ELISA and that of 1.31–2.64 mg/mL (expanded uncertainty, 0.67 mg/mL; coverage ratio, $k=3$; confidence level, 99%) for intralaboratory quality control of IgA impurity quantification by kinetic nephelometry, radial immunodiffusion, and ELISA.

Conclusions. The pharmacopoeial standard developed in the study has been included in the register of standards of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation as the Reference Standard for the Content of Immunoglobulin Class A (IgA) (Registry No. 3.1.00454). The pharmacopoeial standard is intended for the standardisation of analytical methods for the determination of the IgA impurity content in parenteral human immunoglobulins.

Key words: human immunoglobulin preparations; pharmacopoeial standard; immunoglobulin A; IgA impurity; certification; kinetic nephelometry; radial immunodiffusion; enzyme immunoassay; ELISA

For citation: Nechaev A.V., Kudasheva E.Yu., Postnova E.L., Volkova R.A., Fadeikina O.V., Borisevich I.V., Movsesyants A.A. Development, certification, and use of a pharmacopoeial standard for the content of immunoglobulin A in human immunoglobulins for parenteral administration. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3–1):443–451. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-443-451>

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

Conflict of interest. I.V. Borisevich has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2012; A.A. Movsesyants has been a member of the Editorial Board of the journal since 2001. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Препараты иммуноглобулинов человека – группа иммунобиологических лекарственных средств, действующим веществом которых являются иммуноглобулины класса G (IgG) человека, выделенные промышленным способом из пула плазмы крови более чем 1000 здоровых доноров. Объединение такого значительно объема субстанции биологического происхождения определяет присутствие в готовых лекарственных формах широкого спектра антител IgG донорской популяции, обеспечивающих заместительный эффект при лечении первичных и вторичных иммунодефицитов. Однако при производстве препаратов иммуноглобулинов существует высокая вероятность выделения, помимо действующего вещества, других белковых компонентов плазмы крови человека, например компонентов фракции иммуноглобулина класса A (IgA).

Присутствие примеси IgA в парентеральных лекарственных формах препаратов иммуноглобулинов человека может стать причиной развития ряда нежелательных реакций со стороны иммунной системы, таких как повышение температуры, озноб, миалгия, артралгия, головная боль, общее недомогание, сыпь, покраснение, зуд, крапивница, анафилактические/анафилактоидные реакции [1]. Для предотвращения возможного развития перечисленных нежелательных реакций необходим контроль препаратов иммуноглобулинов человека по содержанию примеси IgA.

В 2009 г. в странах Европейского союза впервые введены фармакопейные требования

по оценке содержания примеси IgA в препаратах иммуноглобулинов человека для внутривенного и подкожного введения любым пригодным иммунохимическим методом¹. Европейские производители препаратов иммуноглобулинов человека для оценки содержания примеси IgA используют методы радиальной иммунодиффузии, кинетической нефелометрии и иммуноферментного анализа (ИФА).

В 2018 г. в Российской Федерации показатель качества «Иммуноглобулин А» был включен в перечень обязательных для оценки качества препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)². Контроль этого показателя проводится с использованием стандартного образца (СО) количественного содержания IgA с применением фармакопейных методов: кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и ИФА³.

Существенное значение при проведении испытаний препаратов иммуноглобулинов человека по показателям специфической безопасности имеют СО [2]. В 1970 г. в реестр СО Всемирной организации здравоохранения включен международный стандартный образец (МСО) содержания иммуноглобулинов G, A, M⁴. МСО представляет собой лиофилизированную сыворотку крови человека, разлитую в ампулы по 1 мл, аттестованную весовым методом и методом радиальной иммунодиффузии. Установлено, что 1 единица активности IgA в МСО соответствует 14,2 мкг IgA (12,1–16,6 мкг) при до-

¹ 07/2022:0918 Human normal immunoglobulin for intravenous administration. European Pharmacopoeia 11th ed.

07/2022:2788 Human normal immunoglobulin for subcutaneous administration. European Pharmacopoeia 11th ed.

² ФС.3.3.2.0008.15 Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ ОФС.1.8.2.0012.18 Количественное определение содержания иммуноглобулинов классов A, M и G в препаратах иммуноглобулинов человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ WHO International standard immunoglobulins G, A, M, human serum. NIBSC code: 67/086. <https://nibsc.org/documents/ifu/67-086.pdf>

верительной вероятности 95%; активность IgA составляет 100 единиц на ампулу МСО (1 мл). МСО рекомендовано использовать при определении содержания примеси IgA в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека методом радиальной иммунодиффузии, а также для аттестации вторичных СО. Следует отметить, что МСО не аттестован для количественного определения содержания примеси IgA с использованием методов кинетической нефелометрии и ИФА, широко применяемых отечественными и зарубежными производителями препаратов иммуноглобулинов человека.

Производители препаратов иммуноглобулинов при использовании методов кинетической нефелометрии и ИФА для оценки содержания примеси IgA применяют СО предприятий, аттестованные по отношению к МСО, или контрольные/калибровочные образцы, входящие в состав иммунохимических наборов реактивов/реагентов для определения концентрации IgA в сыворотке/плазме крови и цереброспинальной жидкости человека.

В настоящее время отсутствует национальный СО содержания IgA в препаратах иммуноглобулинов человека, аттестованный в соответствии с тремя фармакопейными методами (метод радиальной иммунодиффузии, метод кинетической нефелометрии и ИФА). Отсутствие единого стандарта не только не позволяет сопоставить результаты, полученные разными методами, но и может стать причиной некорректной оценки содержания нежелательной примеси IgA в препаратах иммуноглобулинов человека.

В период с 2018 по 2022 г. в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России проводились исследования по разработке и аттестации фармакопейного стандартного образца (ФСО) — «Стандартный образец содержания иммуноглобулинов класса А (IgA)».

Цель работы — определить порядок разработки, аттестации и применения фармакопейного стандартного образца (ФСО) содержания IgA в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

Материалы и методы

Материалы

Исследуемые образцы кандидата в ФСО содержания IgA изготавливали с использовани-

ем субстанции «Плазма человека для фракционирования», соответствующей требованиям ГФ РФ⁵, в ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» в четыре этапа:

- объединение индивидуальных единиц субстанции «Плазма человека для фракционирования» (не менее 1000 единиц) в производственный пул (загрузку) в соответствии с промышленным регламентом производства иммуноглобулина человека нормального, раствора для внутривенного введения;
- отбор требуемого объема плазмы человека для фракционирования из производственного пула;
- добавление к объему материала для изготовления ФСО 1% раствора CaCl₂ с последующим центрифугированием с целью получения сыворотки крови человека;
- стерилизующая фильтрация в соответствии с промышленным регламентом и розлив сыворотки крови человека в асептических условиях во флаконы для лекарственных средств по 2,0 мл без добавления стабилизаторов и консервантов с последующей укупоркой.

Оборудование

Для проведения аттестации использовали следующее оборудование с действительным на момент испытаний свидетельством о поверке: дозаторы механические одноканальные 100–1000 мкл и 20–200 мкл (Eppendorf AG, Германия); CO₂-инкубатор МСО-15АС (Sanyo Electric Co, Япония); анализатор специфических белков Image 800 (Beckman Coulter, США); анализатор иммунологический Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Финляндия); весы электронные Adventurer AR5120 (OHAUS Corporation, Швейцария); баня водяная ED-19M (Julabo Labortechnik GmbH, Германия); холодильник LKv 3912 (Liebherr-Hausgeraete Lienz, Австрия).

Методы

Аттестацию кандидата в ФСО содержания IgA проводили методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии по Манчини и ИФА в соответствии с требованиями ОФС.1.8.2.0012.18⁶. Для аттестации кандидата в ФСО использовали многократное

⁵ ФС.3.3.2.0001.19 Плазма человека для фракционирования. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018 (введена взамен ФС.3.3.2.0001.18 «Плазма человека для фракционирования» приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 185 от 29.03.2019 «Об утверждении общей фармакопейной статьи и фармакопейной статьи»).

⁶ ОФС.1.8.2.0012.18 Количественное определение содержания иммуноглобулинов классов А, М и G в препаратах иммуноглобулинов человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

сравнительное испытание с МСО содержания иммуноглобулинов G, A, M (WHO International Standard Immunoglobulins G, A and M, Human Serum. NIBSC code: 67/086⁷). Установление значений аттестуемой характеристики кандидата в ФСО проводили по результатам, полученным в одной лаборатории с привлечением двух аналитиков (I и II) в течение 10 сут. Аналитики I и II использовали один флакон с кандидатом в ФСО и аликвоту из одной ампулы МСО при проведении аттестации каждым из трех методов.

Аттестуемой характеристикой ФСО являлось содержание IgA, выраженное в мг/мл.

Определение аттестуемой характеристики (содержание IgA) в сериях кандидата в ФСО.

Определение содержания IgA методом кинетической нефелометрии. Для определения содержания IgA использовали диагностические наборы реагентов для кинетической нефелометрии (Beckman Coulter, США). В день проведения аттестации наборы реагентов извлекали из холодильника (2–8 °С) и выдерживали при комнатной температуре не менее 30 мин. Далее готовили по два независимых разведения ФСО и МСО путем добавления к 1 мл ФСО и МСО 9 мл растворителя 1, входящего в состав набора. Последующие этапы метода воспроизводили в соответствии с инструкцией производителя набора реагентов.

Определение содержания IgA методом радиальной иммунодиффузии. Для определения содержания IgA использовали диагностические наборы реагентов для радиальной иммунодиффузии: «Набор реагентов Моно-РИД-G, A, M. Сыворотки диагностические моноспецифические против IgG(H), IgA(H), IgM(H) человека сухие» (АО «НПО «Микроген», Россия). В день проведения аттестации наборы реагентов извлекали из холодильника (2–8 °С) и выдерживали при комнатной температуре не менее 30 мин.

В работе использовали следующие вспомогательные реактивы и реагенты: 0,9 % раствор NaCl (ООО НПП «ПанЭко», Россия); «КлиниТест-ЭФ П Амидо» краситель амидо черный 10Б («ЭКОсервис НПЦ», Россия); «КлиниТест-ЭФ ПР» промывающий раствор для электрофореза («ЭКОсервис НПЦ», Россия); агар (Noble agar, Difco, Becton Dickinson).

В день проведения аттестации готовили 2% раствор агара. Для этого навеску (2 г) агара вносили в колбу с 100 мл 0,9% раствором NaCl, перемешивали и оставляли для набухания при комнатной температуре на 30 мин, затем помещали колбу на водяную баню и нагревали до полного

расплавления агара и получения прозрачного однородного раствора, не содержащего видимых включений. Далее содержимое ампулы с сывороткой против IgA(H) из набора реагентов растворяли в 1 мл воды и добавляли 0,9% раствор NaCl, доводя концентрацию до уровня, превышающую в 2 раза титр, указанный на ампуле (титр 1:28 – 1 мл антисыворотки и 13 мл раствора 0,9% NaCl). Пробирку с разведенной антисывороткой нагревали на водяной бане при температуре 53±3 °С в течение 30 мин и смешивали с расплавленным агаровым гелем (пробирку с агаром предварительно охлаждали; агар не должен застыть) в равных количествах до получения слоя агара высотой 1 мм (7,5 мл антисыворотки + 7,5 мл агара). Далее содержимое ампулы МСО растворяли в 1 мл воды и готовили в двух повторностях серию последовательных разведений МСО и ФСО в 2, 4 и 8 раз с помощью 0,9% раствора NaCl. Последующие этапы метода воспроизводили в соответствии с инструкцией производителя набора реагентов.

Определение содержания IgA методом иммуноферментного анализа. Для определения содержания IgA использовали диагностические наборы реагентов для иммуноферментного определения концентрации IgA – «IgA общий-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия). В день проведения испытаний наборы реагентов извлекали из холодильника (2–8 °С) и выдерживали при комнатной температуре не менее 30 мин.

В день проведения аттестации проводили подготовку рабочего раствора для разведения сывороток (PPC) и промывочного раствора в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов. Далее готовили в двух повторностях серию последовательных разведений ФСО и МСО: в 1000, 2000, 4000 и 8000 раз (в качестве раствора для разведения использовали PPC, входящий в состав набора реагентов). Затем в лунки 96-луночного планшета вносили по 20 мкл приготовленных разведений ФСО и МСО и по 100 мкл PPC. Последующие этапы метода проводили в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов.

Определение содержания примеси IgA в парентеральных лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека. Определение содержания примеси IgA проводили методами радиальной иммунодиффузии и ИФА с использованием ФСО содержания IgA. В испытании применяли следующие образцы отечественных коммерчески доступных препаратов иммуноглобулинов человека различных производителей:

⁷ <https://nibsc.org/documents/ifu/67-086.pdf>

- № 1 и 2 – образцы препарата иммуноглобулина человека для внутримышечного введения;
- № 3–5 – образцы препарата иммуноглобулина человека для внутривенного введения;
- № 6 и 7 – образцы препарата иммуноглобулина человека для подкожного введения.

Для проведения испытания с использованием метода радиальной иммунодиффузии готовили в двух повторностях три последовательных разведения ФСО в 2, 4, 8 раз с помощью 0,9% раствора NaCl. Проводили подготовку предварительных разведений образцов № 1 и 2 в 10 раз с применением 0,9% раствора NaCl (в трех повторностях). Образцы № 3–7 вносили без предварительного разведения в трех повторностях.

Для проведения испытания с использованием метода ИФА готовили РРС и промывочный раствор в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов для ИФА определения IgA. Далее проводили подготовку серии последовательных разведений ФСО в 1000, 2000, 4000, 8000 раз двух повторностях (в качестве раствора для разведения использовали РРС, входящий в состав набора реагентов). Готовили серию последовательных разведений образцов № 1–7 – в 1000, 2000, 4000, 8000 раз в двух повторностях (в качестве раствора для разведения использовали РРС).

Исследование стабильности ФСО. Исследование стабильности ФСО по показателю «Содержание IgA» проводили методом естественного старения в соответствии с ОФС.1.1.0007.18⁸.

Статистическая обработка результатов. Использовали методы описательной статистики и дисперсионного анализа в программах Microsoft Office Excel (Microsoft, США) и Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США), рассчитывая среднеарифметическое значение ($\bar{X}_{cp}$) при $n=60$, стандартное отклонение (S), относительное стандартное отклонение, расширенную неопределенность аттестованного значения (U): для количественного определения ($U=2S$) и для внутрилабораторного контроля качества аналитических работ ($U=3S$). Значимость статистических гипотез проверяли при уровне доверительной вероятности 95% (принятый уровень значимости $p=0,05$) [3]⁹.

В качестве аттестованного значения содержания IgA принимали среднее значение $\bar{X}_{cp}$ по результатам определения IgA методами ки-

нетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и ИФА ($n=60$).

Результаты и обсуждение

В соответствии с программой аттестации¹⁰ кандидат в ФСО содержания IgA, представляющий собой стерильную сыворотку крови человека во флаконах по 2 мл без консервантов и стабилизаторов, был аттестован фармакопейными методами: кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и ИФА. Результаты аттестации кандидата в ФСО содержания IgA представлены в *таблице 1*.

Результаты проведения статистического анализа при определении содержания IgA двумя аналитиками позволили сделать вывод об отсутствии значимых различий между дисперсиями сравниваемых выборок: значения F -критерия, рассчитанные по экспериментальным данным (1,2 – для метода кинетической нефелометрии; 2,25 – для метода радиальной иммунодиффузии; 1,34 – для метода ИФА), не превышают критическую величину $F_{кр}=4,41$ при уровне значимости $\alpha=0,05$ и числе степеней свободы: внутригрупповом $n=18$, межгрупповом $m=1$. Выявлено отсутствие значимых различий между средними значениями сравниваемых выборок: значения t -критерия, рассчитанные по экспериментальным данным (0,01 – для метода кинетической нефелометрии; 0,22 – для метода радиальной иммунодиффузии; 0,39 – для метода ИФА), не превышают критическую величину $t_{кр}=2,01$ при уровне значимости $\alpha=0,05$ и числе степеней свободы $n=18$.

Учитывая отсутствие статистической значимости различий результатов, полученных двумя операторами, значение аттестованной характеристики рассчитывали с использованием всех полученных данных. Значение аттестованной характеристики ФСО (содержание IgA) составило 1,98 мг/мл. Расширенная неопределенность (U) аттестованного значения ФСО, рассчитанная как $2S$, составила 0,44 мг/мл (коэффициент охвата $k=2$, уровень доверия 95%). ФСО с данной аттестованной характеристикой может быть использован для количественного определения содержания примеси IgA в препаратах иммуноглобулинов человека методами радиальной иммунодиффузии и ИФА [4]. Для метода кинетической нефелометрии ФСО может быть использован только как внутрилабораторный контроль

⁸ ОФС.1.1.0007.18 Стандартные образцы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁹ ГОСТ Р ИСО 21748-2021. Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений.

¹⁰ ОФС.1.1.0007.18 Стандартные образцы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 1. Результаты аттестации кандидата в фармакопейный стандартный образец содержания IgA методами кинетической нефелометрии (КН), радиальной иммунодиффузии (РИД) и иммуноферментного анализа (ИФА)

Table 1. Certification results for the candidate pharmacopoeial standard for the content of IgA tested by kinetic nephelometry (KN), radial immunodiffusion (RID), and enzyme immunoassay (ELISA)

Статистический параметр <i>Statistical parameter</i>	Результаты статистического анализа при определении содержания IgA методом <i>Statistical analysis results for IgA quantification by</i>					
	КН <i>KN</i>		РИД <i>RID</i>		ИФА <i>ELISA</i>	
	Анали- тик I <i>Analyst I</i>	Анали- тик II <i>Analyst II</i>	Анали- тик I <i>Analyst I</i>	Анали- тик II <i>Analyst II</i>	Анали- тик I <i>Analyst I</i>	Анали- тик II <i>Analyst II</i>
Среднее значение содержания IgA ± стандартное отклонение, мг/мл (n=10) <i>Mean IgA content ± standard deviation, mg/mL (n=10)</i>	2,13±0,12	2,13±0,13	1,96±0,13	1,98±0,19	1,80±0,27	1,85±0,24
Среднее арифметическое значение содержания IgA, мг/мл (n=20) <i>Mean IgA content, mg/mL (n=20)</i>	2,13		1,97		1,82	
Стандартное отклонение, мг/мл (n=20) <i>Standard deviation, mg/mL (n=20)</i>	0,12		0,16		0,25	
Относительное стандартное отклонение, % <i>Relative standard deviation, %</i>	5,63		8,17		13,66	
Критерий Фишера $F_{кр} = 4,41$ при уровне значимости $\alpha = 0,05$, числе степеней свободы: внутригрупповом $n = 18$, межгрупповом $m = 1$ <i>Fisher's test</i> <i>Reference value, $F_{cr} = 4.41$; significance level, $\alpha = 0.05$; number of degrees of freedom, $n = 18$ (intragroup) and $m = 1$ (intergroup)</i>	Различие статисти- чески незначимо $F = 1,2 < F_{кр}$ <i>Difference is not statistically significant</i> $F = 1.2 < F_{cr}$		Различие статистиче- ски незначимо $F = 2,25 < F_{кр}$ <i>Difference is not statistically significant</i> $F = 2.25 < F_{cr}$		Различие статистиче- ски незначимо $F = 1,34 < F_{кр}$ <i>Difference is not statistically significant</i> $F = 1.34 < F_{cr}$	
Критерий Стьюдента $t_{кр} = 2,01$ при уровне значимости $\alpha = 0,05$, числе степеней свободы $n = 18$ <i>Student's t-test</i> <i>Reference value, $t_{cr} = 2.01$; significance level, $\alpha = 0.05$; number of degrees of freedom, $n = 18$</i>	Различие статисти- чески незначимо $t = 0,01 < t_{кр}$ <i>Difference is not statistically significant</i> $t = 0.01 < t_{cr}$		Различие статистиче- ски незначимо $t = 0,22 < t_{кр}$ <i>Difference is not statistically significant</i> $t = 0.22 < t_{cr}$		Различие статистиче- ски незначимо $t = 0,39 < t_{кр}$ <i>Difference is not statistically significant</i> $t = 0.39 < t_{cr}$	
Общее среднее арифметическое значение результатов определения содержания IgA, мг/мл (n=60) Аттестованное значение <i>Total mean IgA content, mg/mL (n=60)</i> <i>Certified value</i>	1,98					
Общее стандартное отклонение, мг/мл (S) (n=60) <i>Total standard deviation, mg/mL (S) (n=60)</i>	0,22					
Относительное стандартное отклонение, % <i>Relative standard deviation, %</i>	11,23					
Расширенная неопределенность значения аттестованной характеристики для количественного определения, $U = 2S$, мг/мл (диапазон аттестованного значения) <i>Expanded uncertainty for the certified parameter for IgA impurity quantification, $U = 2S$, mg/mL (certified value range)</i>	0,44 (1,54–2,42)					
Расширенная неопределенность значения аттестованной характеристики для внутри лабора- торного контроля качества аналитических работ, $U = 3S$, мг/мл (диапазон аттестованного значения) <i>Expanded uncertainty for the certified parameter for intralaboratory quality control of IgA impurity quantification, $U = 3S$, mg/mL (certified value range)</i>	0,67 (1,31–2,64)					

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

качества, так как в этом случае исследования проводят с помощью автоматизированных аналитических систем, уже имеющих калибровочную систему и соответствующие статистические программы расчета.

Проведена оценка содержания примеси IgA в образцах лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутримышечного, внутривенного и подкожного введения методами радиальной иммунодиффузии и ИФА с использованием ФСО содержания IgA (табл. 2).

ФСО содержания IgA может быть использован для оценки внутрилабораторного качества аналитических работ при проведении испытаний по оценке содержания примеси IgA в препаратах иммуноглобулинов человека методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и иммуноферментного анализа [4]. При этом значение аттестованной характеристики выражают как допустимый диапазон значений – от 1,31 до 2,64 мг/мл (расширенная неопределенность 0,67 мг/мл; коэффициент охвата $k=3$; уровень доверия 99%).

При изучении стабильности трех серий кандидата в ФСО в режиме реального времени методом естественного старения в условиях хранения при температуре от 2 до 8 °C в защищенном от света месте установлено, что срок годности ФСО содержания IgA составляет 1 год.

По результатам проведенных исследований ФСО содержания IgA включен в реестр ФСО ГФ РФ под названием «Стандартный образец содержания иммуноглобулинов класса А (IgA)» и реестровым номером ФСО 3.1.00454¹¹. ФСО предназначен для стандартизации методов оценки содержания примеси IgA в парентеральных лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

Заключение

Разработан и аттестован ФСО 3.1.00454 «Стандартный образец содержания иммуноглобулинов класса А (IgA)», предназначенный для количественного определения содержания примеси

Таблица 2. Результаты оценки содержания примеси IgA в образцах парентеральных лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека методами радиальной иммунодиффузии (РИД) и иммуноферментного анализа (ИФА)

Table 2. Results of IgA impurity determination in parenteral human immunoglobulin samples by radial immunodiffusion (RID) and enzyme immunoassay (ELISA)

Номер образца Sample number	Среднее значение содержания IgA ($X_{cp} \pm S$), мг/мл, установленное методом Mean IgA content ($X_{mean} \pm S$), mg/mL, quantified by	
	РИД RID	ИФА ELISA
1	0,423±0,016	0,458±0,013
2	0,455±0,035	0,429±0,022
3	0,423±0,026	0,443±0,014
4	0,423±0,010	0,473±0,022
5	0,422±0,021	0,454±0,013
6	0,428±0,017	0,447±0,015
7	0,443±0,020	0,436±0,022

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

IgA в препаратах иммуноглобулинов человека методами радиальной иммунодиффузии и иммуноферментного анализа, а также для внутрилабораторного контроля качества аналитических работ при проведении испытаний по оценке содержания примеси IgA в препаратах иммуноглобулинов человека методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и иммуноферментного анализа.

Результаты проведенных исследований позволили рекомендовать применение разработанного стандартного образца в проекте общей фармакопейной статьи Государственной фармакопеи Российской Федерации «Количественное определение содержания иммуноглобулинов классов G, M и A в препаратах иммуноглобулина человека» (взамен действующей ОФС.1.8.2.0012.18).

Литература/References

1. Esmaeilzadeh H, Askarisarvestani A, Hosseini N, Samimi S, Shafiei A, Mahdavian SA, et al. Adverse reactions in a large cohort of patients with inborn errors of immunity receiving intravenous immunoglobulin. *Clin Immunol*. 2021;230:108826. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108826>
2. Корнилова ОГ, Кривых МА, Волкова РА, Борисевич ИВ. Стандартные образцы в оценке специфической безопасности препаратов иммуно-

глобулинов и альбумина человека: особенности разработки, аттестации и применении. *Стандартные образцы*. 2018;(3–4):33–41. Kornilova OG, Krivikh MA, Volkova RA, Borisevich IB. Reference materials used for specific safety evaluation of human immunoglobulin and human albumin products: features of development, certification and application. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2018;(3–4):33–41 (In Russ.).

¹¹ <https://www.regmed.ru/produkt-n-service/fso/fso-registry/fso-of-biological-origin/>

<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2018-14-3-4-33-41>

3. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1998.
Glantz S. *Primer of biostatistics*. Moscow: Practice; 1998 (In Russ.).
4. Кудашева ЭЮ, Нечаев АВ, Лешина СА, Волкова РА, Клепикова АГ. Композиция для определения со-

держания иммуноглобулинов IgA в лекарственных препаратах. Патент Российской Федерации № 2794887; 2023.

Kudasheva EYu, Nechaev AV, Leshina SA, Volkova RA, Klepikova AG. Composition for determining the content of IgA immunoglobulins in medicinal products. Patent of the Russian Federation No. 2794887; 2023 (In Russ.). EDN: [RUUTJV](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.В. Нечаев** — экспериментальная работа (проведение испытаний методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и иммуноферментного анализа, статистическая обработка результатов), анализ и интерпретация результатов, написание текста рукописи; **Э.Ю. Кудашева, Е.Л. Постнова, О.В. Фадейкина** — дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов, написание текста рукописи; **Р.А. Волкова, И.В. Борисевич** — концепция исследования; **А.А. Мовсесянц** — общее руководство работами, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.V. Nechaev** conducted experiments by kinetic nephelometry, radial immunodiffusion, and enzyme immunoassay; performed statistical processing, analysis, and interpretation of the study results; and drafted the manuscript. **E.Yu. Kudasheva, E.L. Postnova, O.V. Fadeikina** designed the study, analysed and interpreted the study results, and drafted the manuscript. **R.A. Volkova, I.V. Borisevich** elaborated the study concept. **A.A. Movsesyants** provided general management and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Нечаев Алексей Викторович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2747-6239>

Nechaev@expmed.ru

Кудашева Эльвира Юрьевна, д-р мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5838-2481>

kudasheva@expmed.ru

Постнова Евгения Леонидовна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1798-4910>

postnova@expmed.ru

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

volkova@expmed.ru

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

fadeikina@expmed.ru

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0713-7419>

borisevichiv@fmba.gov.ru

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

movsesyants@expmed.ru

Alexey V. Nechaev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2747-6239>

Nechaev@expmed.ru

Elvira Yu. Kudasheva, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5838-2481>

kudasheva@expmed.ru

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

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1798-4910>

postnova@expmed.ru

Rauza A. Volkova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

volkova@expmed.ru

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

fadeikina@expmed.ru

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0713-7419>

borisevichiv@fmba.gov.ru

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

movsesyants@expmed.ru

Поступила 02.08.2022

После доработки 30.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 2 August 2022

Revised 30 August 2023

Accepted 13 September 2023



Оценка неопределенности результатов измерений при определении потери в массе при высушивании биологических лекарственных препаратов

О.В. Фадейкина[✉], А.А. Воропаев, Д.С. Давыдов, Р.А. Волкова

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

✉ Фадейкина Ольга Васильевна; fadeikina@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Исследование неопределенности результатов измерений, проводимых испытательными лабораториями, предусмотрено ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Оценивание неопределенности методик испытаний биологических лекарственных препаратов представляет собой сложную задачу, требующую особого подхода и значительных временных и трудовых ресурсов. Актуальной является оценка неопределенности измерений на примере методики определения потери в массе при высушивании биологических лекарственных препаратов, поскольку в процессе ее реализации анализируется именно результат измерения (взвешивания) физической величины — массы.

Цель. Оценить неопределенность результатов измерений при определении потери в массе при высушивании биологических лекарственных препаратов.

Материалы и методы. Субстанция-порошок для изготовления бифидосодержащего препарата (исследуемый образец). Испытание проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации ОФС.1.2.1.0010.15. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы Microsoft Excel. Расчет неопределенности проводили двумя способами: при помощи подхода «снизу вверх» и с использованием доверительного интервала.

Результаты. Идентифицированы составляющие неопределенности, влияющие на результат измерения потери в массе при высушивании. Расширенная неопределенность, рассчитанная с использованием подхода «снизу вверх», составила 0,34% (коэффициент охвата $k=2$, уровень доверия приблизительно 95%), при этом наибольший вклад вносит неопределенность измерения массы бюкса после высушивания образца — 0,147%; наименьший вклад — неопределенность измерения массы пустого бюкса — 0,003%. Неопределенность двух параллельных измерений, рассчитанная с помощью доверительного интервала, составила 0,32%.

Выводы. Два подхода к расчету неопределенности результатов измерений потери в массе при высушивании дают сопоставимые результаты. Анализ бюджета неопределенности выявил, что наибольший вклад в результат испытания вносит неопределенность измерения массы бюкса после высушивания образца, что требует тщательного контроля условий пробоподготовки. Для оценки неопределенности может быть использован способ расчета с помощью доверительного интервала. Методология анализа методики потери в массе при высушивании с точки зрения выявления факторов, влияющих на результат испытания, и представленные способы расчета неопределенности могут быть полезны специалистам испытательных лабораторий.

Ключевые слова: потеря в массе при высушивании; неопределенность результатов измерений; бюджет неопределенности; биологические лекарственные препараты

Для цитирования: Фадейкина О.В., Воропаев А.А., Давыдов Д.С., Волкова Р.А. Оценка неопределенности результатов измерений при определении потери в массе при высушивании биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):452–462. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-452-462>

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.

Estimation of measurement uncertainty for the determination of loss on drying of biologicals

Olga V. Fadeikina , Andrey A. Voropaev, Dmitry S. Davydov, Rauza A. Volkova

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

 Olga V. Fadeikina; fadeikina@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. GOST ISO/IEC 17025-2019 requires testing laboratories to evaluate the measurement uncertainty of their results. Estimating the uncertainty of analytical methods intended for biologicals is a challenging task that requires time, effort, and a special approach. Measurement uncertainty estimation is of particular interest in the case of measuring loss on drying (LOD) for biologicals, since LOD testing procedures involve analysing measurements of a physical value, i.e. mass.

Aim. This study aimed to estimate the measurement uncertainty of LOD determination in biological medicinal products.

Materials and methods. The study examined a powdered active substance intended for a *Bifido-bacterium* product (test sample). The authors conducted the LOD test in accordance with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (OFS.1.2.1.0010.15). Statistical processing of the results was performed using Microsoft Excel. To estimate the measurement uncertainty, the authors employed the bottom-up approach or used the standard deviation from testing results.

Results. The authors identified the uncertainty components that affected the LOD determination results. When calculated using the bottom-up approach, the expanded uncertainty was 0.34% (coverage factor, $k=2$; approximate confidence level, 95%). In particular, the largest contributor to the expanded uncertainty was the uncertainty of measuring the mass of weighing bottles containing dried test samples (0.147%), whereas the smallest contributor was the uncertainty of weighing empty bottles (0.003%). When calculated using the standard deviation, the uncertainty of two parallel measurements amounted to 0.32%.

Conclusions. Both approaches to calculating LOD measurement uncertainty yield comparable results. According to the uncertainty budget analysis, the uncertainty of measuring the mass of weighing bottles with dried test samples is the major contributor to the test result. For this reason, the conditions of sample preparation should be carefully controlled. The study results confirm that the LOD measurement uncertainty can be calculated using the standard deviation. Testing laboratory teams may benefit from the methods for identifying the factors influencing LOD test results and the methods for calculating the uncertainty of measurement described in this study.

Key words: loss on drying; measurement uncertainty; uncertainty budget; biologicals

For citation: Fadeikina O.V., Voropaev A.A., Davydov D.S., Volkova R.A. Estimation of measurement uncertainty for the determination of loss on drying of biologicals. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3–1):452–462. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-452-462>

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

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

Введение

В соответствии с требованиями межгосударственного стандарта ГОСТ ISO/IEC 17025-2019¹ лаборатория, проводящая испытания, должна осуществлять оценку неопределенности измерений. Неопределенность является характеристикой качества результата измерения. Сведения о неопределенности необходимы для того, чтобы оценить достоверность полученного результата в соответствии с предъявляемыми требованиями² и иметь возможность сопоставить его с результатами, полученными в других лабораториях.

В ряде документов Департамента по вопросам стандартизации биологических препаратов, сети официальных лабораторий по контролю лекарственных средств и здравоохранения (Department of Biological Standardisation, Network of Official Medicines Control Laboratories, and Healthcare, DBO) Европейского директората по качеству лекарственных средств и здравоохранения (European Directorate for the Quality of Medicines, Council of Europe, EDQM) описано несколько подходов к оценке неопределенности результатов измерений при количественных испытаниях, проводимых в официальных лабораториях по контролю качества лекарственных средств³.

Подход «снизу вверх» («пошаговый», bottom-up) предполагает проведение оценки всех факторов неопределенности, возникающих в результате влияния каждого отдельно взятого источника. Неопределенность измерений, оцениваемую с помощью стандартного отклонения параллельных измерений, называют стандартной (u). Для оценки разброса значений, который может быть приписан измеряемой величине с определенной долей вероятности (уровнем доверия), вычисляют суммарную (u_c) и/или расширенную неопределенность (U).

Оценивание неопределенности методик испытаний биологических лекарственных препаратов (БЛП) представляет собой сложную задачу, требующую особого подхода и значительных временных и трудовых ресурсов [1]. При реализации большинства биологических и аналитических методик, применяемых при контроле БЛП, аналитики имеют дело с результатом испытания,

а не прямого измерения конкретной величины, что осложняет применение традиционных метрологических подходов как при оценке показателей точности методик, так и при оценке их неопределенности [2].

Методика определения потери в массе при высушивании была использована в качестве модели для оценки неопределенности, так как в процессе ее реализации аналитик имеет дело именно с результатом измерения (взвешивания) физической величины — массы.

Физические методики оценки остаточной влажности (показатель качества «Потеря в массе при высушивании») в лиофилизированных БЛП широко применяются из-за простоты их выполнения, универсальности, отсутствия необходимости использования сложного оборудования. В основе данных методик лежит разница давления над поверхностью образца, которое должно превышать парциальное давление паров воды окружающей среды, что достигается высушиванием пробы при высоких температурах (например⁴, при 100–105 °С). Парциальное давление можно изменить физическим способом, создавая вакуум, или химически, используя влагопоглотители, например оксид фосфора. В Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ)⁵ приведены все вышеперечисленные методики для определения потери в массе при высушивании лекарственных препаратов. Испытания проводят при разных температурах и давлении в зависимости от типа образцов.

Однако описанная в ГФ РФ методика оставляет вне внимания ряд важных аспектов пробоподготовки, связанных с проведением испытаний по потере в массе при высушивании, которые необходимо учесть для получения достоверных результатов.

1. Высота слоя навески образца. Высота слоя влияет на скорость процесса высушивания образца при одинаковой массе навески. При фиксированном времени высушивания разница в высоте слоя будет оказывать влияние на результаты измерений. Косвенно толщина слоя лимитируется диаметром бюкса и массой навески⁶. Возможным решени-

¹ ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

² Там же.

³ Evaluation of measurement uncertainty. Core document (PA/PH/OMCL (18) 145 R1 CORR). EDQM; 2020.

⁴ ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁵ Там же.

⁶ Там же.

ем является уточнение методики, аналогично описанию методики в Фармакопее США⁷, где указывается, что образец должен быть равномерно распределен в бюксе и высота слоя не должна превышать 5 мм (или 10 мм для рыхлых веществ).

2. Размер частиц в навеске образца. В ГФ РФ отсутствуют рекомендации относительно размера частиц при формировании навески образца, хотя размер частиц может непосредственно влиять на скорость и полноту процесса высушивания. В Фармакопее США⁸ рекомендуемый диаметр частиц составляет примерно 2 мм.
3. Гигроскопичность образца. Лиофилизированные препараты обладают гигроскопичностью. Скорость абсорбции влаги из окружающей среды зависит от влажности окружающего воздуха и времени взаимодействия. Наилучшим способом выполнения методики является быстрое формирование навески в специальном боксе с сухим воздухом [3].

Влияние на неопределенность результатов испытаний таких факторов, как гигроскопичность, высота слоя образца, размер частиц в навеске, в данной работе не оценивали. Проведение валидационных исследований позволит инициировать внесение в ГФ РФ изменений, касающихся подготовки образцов.

При проведении весового анализа требуется строгое выполнение правил взвешивания пробы, а также соблюдения определенных условий окружающей среды⁹ для максимального исключения неконтролируемых факторов. К основным условиям относят температуру образца (необходимо выдерживание образца при комнатной температуре) и влажность (при низкой влажности возможно накопление электростатического заряда [4]; при высокой влажности гигроскопичные образцы будут набирать влагу). В отношении пробы, подвергающейся анали-

зу, важна ее физическая однородность, высота слоя в бюксе.

Анализ данных литературы показал отсутствие единого документа, в соответствии с требованиями которого можно было бы провести оценку неопределенности результатов испытаний лекарственного средства. Описанный в ГФ РФ¹⁰ подход к оценке неопределенности аналитической методики носит общий характер. Способы расчета неопределенности, приведенные в ГОСТ¹¹, не учитывают особенности проведения испытаний лекарственных средств. Тем не менее расчет неопределенности в настоящем исследовании был выполнен согласно ГОСТ 34100.3-2017, принимая во внимание примеры, приведенные в документе EDQM¹².

Согласно ГОСТ 34100.3-2017¹³ в общем случае процедура оценки неопределенности состоит из следующих этапов.

- Этап 1 – установление измеряемой величины.
- Этап 2 – идентификация источников неопределенности и составление бюджета неопределенности.
- Этап 3 – количественная оценка составляющих неопределенности.
- Этап 4 – расчет суммарной стандартной неопределенности (u_c), который проводится путем суммирования всех компонентов неопределенности (u_i), выраженных в виде стандартных отклонений. В случае независимых результатов, когда отсутствует корреляция величин, суммирование проводится с учетом весовых коэффициентов (коэффициенты чувствительности c_i) вклада каждой неопределенности согласно формуле (1):

$$u_c = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 \times u_i^2}. \quad (1)$$

Математически коэффициенты чувствительности являются первыми производными

⁷ USP 41–NF36 <731> Loss on drying.

⁸ Там же.

⁹ Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза (утв. Решением Совета Евразийской экономической комиссии № 77 от 03.11.2016).

¹⁰ ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

¹¹ ГОСТ Р ИСО 21748-2021. Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений. ГОСТ 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008. Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения.

¹² Evaluation of measurement uncertainty. Annex 1: Estimation of measurement uncertainty of using bottom-up approach. Annex 1.1: Estimation of measurement uncertainty of concentration of solutions prepared in laboratory (PA/PH/OMCL (18) 146 R1 CORR). EDQM; 2020.

¹³ ГОСТ 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008. Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения.

функции измерения от входящих величин¹⁴ и определяют зависимость результата измерения от изменения этих величин.

- Этап 5 — расчет расширенной неопределенности. Вычисление расширенной неопределенности требуется для определения интервала вокруг результата измерения, в который, как ожидается, попадает большая часть значений, приписанных измеряемой величине. Расчет расширенной неопределенности (U) проводится путем умножения суммарной неопределенности (u_c) на выбранный коэффициент охвата (k) по формуле (2):

$$U = k \times u_c. \quad (2)$$

Коэффициент охвата обычно принимает значение от 2 до 3 для уровня доверия приблизительно 95 и 99%¹⁵ соответственно.

- Этап 6 — анализ вклада различных источников неопределенности. Значимый вклад в общую неопределенность вносят только некоторые компоненты.
- Этап 7 — представление результата (в виде стандартной или расширенной неопределенности). При записи результата в форме $x \pm U$ указывается, какая именно неопределенность (расширенная или стандартная) приводится после знака « $\pm$ ». В случае расчета расширенной неопределенности обязательно указывают значение коэффициента охвата k и уровня доверия, представляя результат в виде: $x \pm U$ (единицы) для k (значение, например, $k=2$) и уровня доверия (значение, например, приблизительно 95%).

В настоящей работе авторами рассмотрены два примера расчета неопределенности результатов определения потери в массе при высушивании: с помощью подхода «снизу вверх»¹⁶ и с помощью доверительного интервала¹⁷.

Цель работы — оценить неопределенность результатов измерений при определении потери в массе при высушивании биологических лекарственных препаратов.

Материалы и методы

Материалы

Субстанция-порошок для изготовления бифидосодержащего препарата отечественного производителя (испытуемый образец).

Оборудование

Взвешивание проводили на весах аналитических ВР 221S (ООО «Сартогосм», Россия), класс точности по ГОСТ 24104-2001¹⁸ — специальный. Предел погрешности взвешивания, указанный в паспорте на весы, составляет $\pm 0,4$ мг ($\theta = \pm 0,0004$ г) при измерении до 50 г.

Методы

Определение потери в массе при высушивании. Испытания проводили согласно требованиям ГФ РФ ОФС.1.2.1.0010.15 (способ 1)¹⁹.

Статистическая обработка результатов. С использованием программы Microsoft Excel рассчитывали общепринятые показатели описательной статистики [5]: среднееарифметическое значение ($\bar{X}_{cp}$), стандартное отклонение (S), доверительный интервал.

Результаты и обсуждение

Оценка неопределенности результатов испытаний по определению потери в массе при высушивании с использованием подхода «снизу вверх»

Расчет расширенной неопределенности результатов испытаний по определению потери в массе при высушивании проводили на примере методики по способу 1²⁰.

Этап 1. Установление измеряемой величины. Измеряемая величина — потеря в массе при высушивании. Единица измерения — процент, %. Количество навесок — 2.

Расчеты потери в массе при высушивании ($X, \%$) проводили по формуле функции измерения (3):

$$X = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100\%, \quad (3)$$

¹⁴ Там же.

¹⁵ Там же.

¹⁶ Evaluation of measurement uncertainty. Annex 1: Estimation of measurement uncertainty of using bottom-up approach (PA/PH/OMCL (18) 146 R1 CORR). EDQM; 2020.

¹⁷ Evaluation of measurement uncertainty. Annex 1: Estimation of measurement uncertainty of using bottom-up approach. Annex 3: Estimation of measurement uncertainty expressed as confidence interval using standard deviation from testing results (PA/PH/OMCL (18) 146 R1 CORR). EDQM; 2020.

Evaluation of measurement uncertainty. Core document (PA/PH/OMCL (18) 145 R1 CORR). EDQM; 2020.

¹⁸ ГОСТ 24104-2001. Весы лабораторные. Общие технические требования.

¹⁹ ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁰ Там же.

Таблица 1. Результаты высушивания бюксов до постоянной массы
Table 1. Results of weighing bottle drying to constant mass

Номер бюкса <i>Weighing bottle</i>	Масса пустого бюкса после первого высушивания, $m_{1,1}$, г <i>Mass of an empty bottle after drying cycle 1, $m_{1,1}$, g</i>	Масса пустого бюкса после второго высушивания, $m_{1,2}$, г <i>Mass of the empty bottle after drying cycle 2, $m_{1,2}$, g</i>	Разница масс между первым и вторым высушиванием, $\Delta m_{1,1} - m_{1,2}$, г <i>Difference in mass after drying cycles 1 and 2, $\Delta m_{1,1} - m_{1,2}$, g</i>
1	8,1538	8,1538	0,0000
2	8,2252	8,2252	0,0000

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

где m_1 — масса пустого бюкса, доведенного до постоянной массы, г; m_2 — масса бюкса с испытуемым образцом до высушивания, г; m_3 — масса бюкса с испытуемым образцом после высушивания, г.

Первый день испытаний. Проводили высушивание двух бюксов до постоянной массы. Бюксы высушивали в течение 2 ч в условиях проведения испытаний (105 °C) в сушильном шкафу. После высушивания бюксы помещали в эксикатор для охлаждения в течение 50 мин. После охлаждения бюксы взвешивали на весах с точностью до 0,0001 г, а затем помещали в сушильный шкаф для высушивания в течение 60 мин. По истечении 60 мин повторяли охлаждение и взвешивание бюксов. Оценивали разность между результатами двух взвешиваний, которая не должна превышать 0,0005 г²¹. Результаты представлены в таблице 1.

Второй день испытаний. Проводили высушивание испытуемого образца. В каждый бюкс вносили навеску испытуемого образца массой около 0,2 г. Взвешивали бюкс с навеской и помещали в сушильный шкаф. Время первого высушивания — 2 ч, время охлаждения бюксов — 50 мин, время второго высушивания — 60 мин. Результаты приведены в таблице 2.

Этап 2. Идентификация источников неопределенности. Проводили анализ процедуры ис-

пытаний. На рисунке 1 представлена диаграмма причинно-следственных связей (диаграмма Исикавы²²), отражающая факторы, которые могут сказаться на результатах измерений: погрешность весов и неточность доведения до постоянной массы — на этапах определения массы пустого бюкса (m_1) и массы с испытуемым веществом после высушивания (m_3); погрешность весов — на этапе взвешивания бюкса с навеской до высушивания (m_2).

Этап 3. Количественная оценка составляющих неопределенности.

Взвешивание пустого бюкса (m_1). Перед проведением испытаний бюксы доводили до постоянной массы высушивания в условиях процедуры испытаний. Масса считается постоянной, если разность результатов двух последовательных взвешиваний не превышает 0,0005 г²³. Неопределенность доведения бюксов до постоянной массы обусловлена неопределенностью при определении массы на весах $u_1(m_1)$ и нечетким определением постоянной массы $u_2(m_1)$, которая может отличаться в пределах 0,0005 г: $u(m_1) = u_1(m_1) + u_2(m_1)$.

Оценивание стандартной неопределенности при определении массы пустого бюкса на весах проводили, используя данные производителя средства измерений (паспортные данные

Таблица 2. Результаты взвешиваний при определении потери в массе при высушивании испытуемого образца
Table 2. Weighing results obtained for weighing bottles with test samples during the determination of loss on drying

Номер бюкса <i>Weighing bottle</i>	Масса бюкса с испытуемым образцом до высушивания, m_2 , г <i>Mass of a bottle with the test sample before drying, m_2, g</i>	Масса бюкса с испытуемым образцом после первого высушивания, $m_{3,1}$, г <i>Mass of the bottle with the test sample after drying cycle 1, $m_{3,1}$, g</i>	Масса бюкса с испытуемым образцом после повторного высушивания, $m_{3,2}$, г <i>Mass of the bottle with the test sample after drying cycle 2, $m_{3,2}$, g</i>	Разница масс между первым и вторым высушиванием, $\Delta m_{3,1} - m_{3,2}$, г <i>Difference in mass after drying cycles 1 and 2, $\Delta m_{3,1} - m_{3,2}$, g</i>
1	8,3536	8,3505	8,3505	0,0000
2	8,4253	8,4223	8,4223	0,0000

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

²¹ ОФС.1.1.0001.15 Правила пользования фармакопейными статьями. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

²² Evaluation of measurement uncertainty. Core document (PA/PH/OMCL (18) 145 R1 CORR). EDQM; 2020.

²³ ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

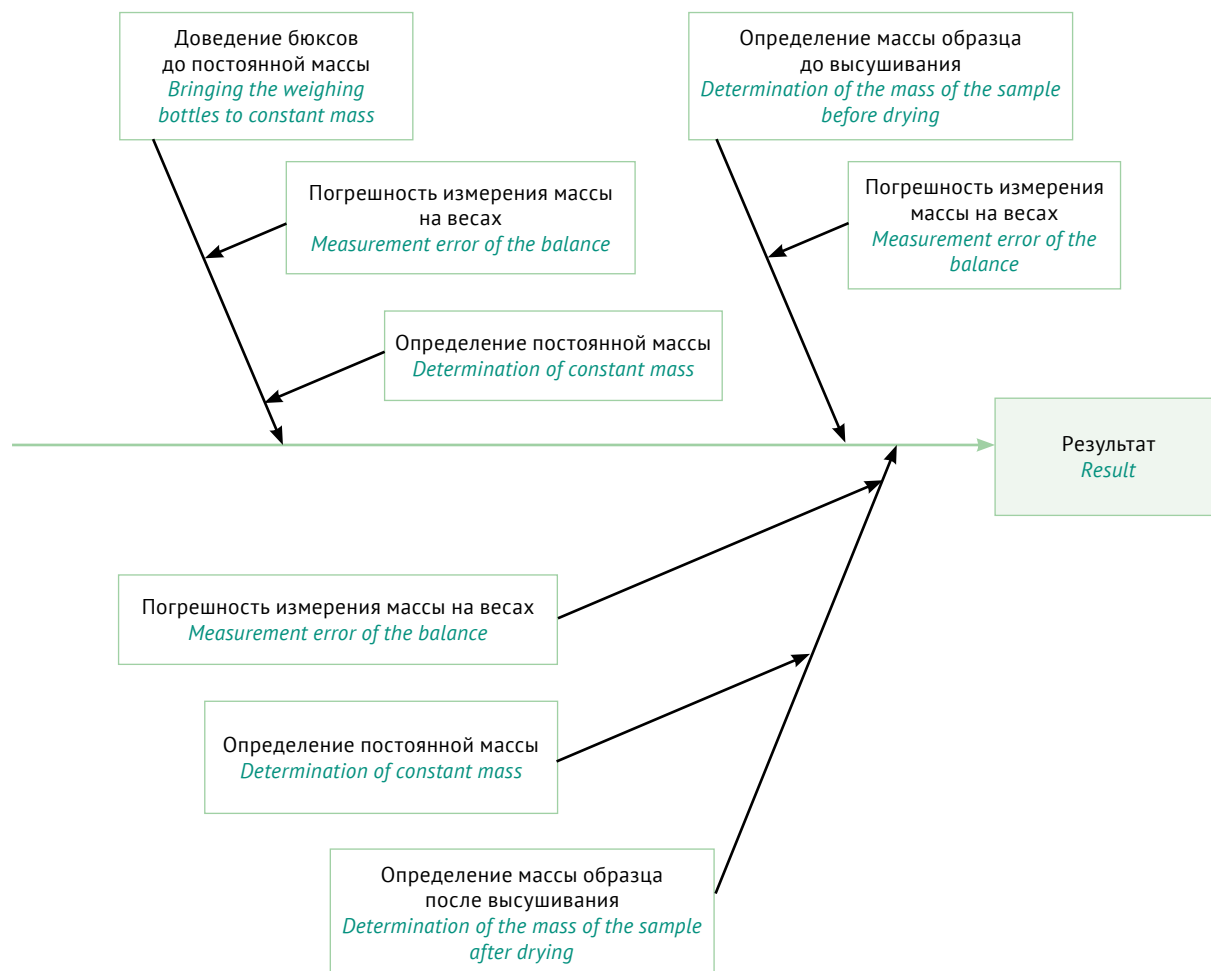


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Источники неопределенности при определении потери в массе при высушивании.

Fig. 1. Sources of uncertainty in the determination of loss on drying

весов). Значение погрешности взвешивания в документации приведено без указания уровня доверия и типа распределения. Согласно ГОСТ 34100.3-2017²⁴ в этом случае предполагается, что погрешность равномерно распределена внутри указанных границ ($\theta = \pm 0,0004$ г) и для расчета неопределенности использовали прямоугольное (равномерное) распределение ($\alpha = \sqrt{3}$). Стандартную неопределенность, связанную с погрешностью весов $u_1(m_1)$, г, рассчитывали по формуле (4):

$$u_1(m_1) = \frac{\theta}{\sqrt{3}} = \frac{0,0004}{\sqrt{3}} = 0,00023. \quad (4)$$

Оценивание неопределенности доведения до постоянной массы проводили исходя из допущения, что распределение является приближенно нормальным, и использовали формулу для расчета предела повторяемости согласно ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 (п. 4.1.2)²⁵. Так как коэффициент для уровня вероятности 95% равен 1,96, то формула расчета стандартной неопределенности $u(x)$, характеризующей вклад процедуры доведения до постоянной массы, принимает вид (5):

$$u(x) = \frac{r}{1,96 \times \sqrt{n}}, \quad (5)$$

²⁴ ГОСТ 34100.3–2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008. Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения.

²⁵ ГОСТ Р ИСО 5725-6–2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике.

где r – предел повторяемости, n – число параллельных измерений.

Неопределенность доведения до постоянной массы $u_2(m_1)$, г, составляет согласно формуле (6):

$$u_2(m_1) = \frac{0,0005}{1,96 \times \sqrt{2}} = 0,00018. \quad (6)$$

При оценивании неопределенности $u(m_1)$, г, необходимо произвести суммирование квадратов определенных выше стандартных неопределенностей согласно формуле (7):

$$u(m_1) = \sqrt{u_1^2(m_1) + u_2^2(m_1)} = \sqrt{(0,00023)^2 + (0,00018)^2} = 0,00029. \quad (7)$$

Взвешивание бюкса с навеской до высушивания, m_2 . Стандартная неопределенность $u(m_2)$ определяется только вкладом погрешности весов, так как процедура доведения до постоянной массы на этом этапе отсутствует ($u_2(m_2) = 0$). Поэтому стандартную неопределенность $u(m_2)$ рассчитывали так же, как и для пустого бюкса $u_1(m_1)$: $u_1(m_2) = 0,00023$.

Взвешивание бюкса с навеской после высушивания, m_3 . Стандартная неопределенность бюкса, связанная с взвешиванием навески образца после высушивания, определяется вкладами погрешности весов и доведения до постоянной массы. Расчет неопределенности для массы бюкса с навеской после высушивания $u_1(m_3)$ проводили таким же образом, как и расчет неопределенности для $u(m_1)$: $u_1(m_3) = u_1(m_1) = u(m_2) = 0,00023$ г.

Неопределенность, связанную с измерением постоянной массы бюксов, определяли аналогично $u_2(m_1)$: $u_2(m_3) = u_2(m_1) = 0,00018$ г. Суммарная неопределенность взвешивания бюкса с навеской после высушивания, рассчитанная по формуле (8), составила 0,00029 г.

Этап 4. Расчет суммарной стандартной неопределенности (u) результата измерения потери в массе образца. Так как все значения получены независимо при различных испытаниях, то формула (8) для расчета суммарной неопределенности ($u_c(X)$) для независимых величин имеет вид²⁶:

$$u_c(X) = \sqrt{c_1^2 u^2(m_1) + c_2^2 u^2(m_2) + c_3^2 u^2(m_3)}, \quad (8)$$

где c_1^2 , c_2^2 , c_3^2 – коэффициенты чувствительности, рассчитываемые как частные производные функции измерения:

$$c_1 = \frac{\partial X}{\partial m_1}; c_2 = \frac{\partial X}{\partial m_2}; c_3 = \frac{\partial X}{\partial m_3};$$

X – уравнение (функция измерения) для расчета потери в массе при высушивании:

$$X = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100\%.$$

В данном примере коэффициенты рассчитывали на основании результатов, полученных для первого бюкса.

Коэффициент чувствительности для массы пустого бюкса согласно формуле (9) равен:

$$c_1 = \left| \frac{\partial X}{\partial m_1} \right| = \frac{100 \times (m_2 - m_3)}{(m_2 - m_1)^2} = \frac{100 \times (8,3536 - 8,3505)}{(8,3536 - 8,1538)^2} = 7,77. \quad (9)$$

Коэффициент чувствительности для массы бюкса с навеской до высушивания согласно формуле (10) равен:

$$c_2 = \left| \frac{\partial X}{\partial m_2} \right| = \frac{100 \times (m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1)^2} = \frac{100 \times (8,3505 - 8,1538)}{(8,3536 - 8,1538)^2} = 492,74. \quad (10)$$

Коэффициент чувствительности для массы бюкса с навеской после высушивания согласно формуле (11) равен:

$$c_3 = \left| \frac{\partial X}{\partial m_3} \right| = \left| \frac{-100}{(m_2 - m_1)} \right| = \frac{100}{8,3536 - 8,1538} = 500,5. \quad (11)$$

Суммарную стандартную неопределенность $u(X)$, %, рассчитывали с учетом коэффициентов чувствительности по формуле (12):

$$u(X) = \sqrt{7,77^2 \times 0,00029^2 + 492,74^2 \times 0,00018^2 + 500,5^2 \times 0,00029^2} = 0,17. \quad (12)$$

Этап 5. Расчет расширенной неопределенности. Расширенную неопределенность U , %, рассчитывали для уровня доверия приблизительно 95% и коэффициента охвата $k = 2$:

$$U = 2 \times 0,17 = 0,34. \quad (13)$$

Этап 6. Анализ вклада различных источников неопределенности. Вклад неопределенности от каждой входной величины рассчитывали как произведение стандартной неопределенности (u_i)

²⁶ ГОСТ 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008. Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения.

этой величины на соответствующий коэффициент чувствительности (c_i). Результаты приведены в таблице 3.

Анализ бюджета неопределенности показал, что наименьший вклад имеет неопределенность измерения массы пустого бюкса – 0,003%. Наибольший вклад вносит неопределенность измерения массы бюкса после высушивания (0,147%), что, по мнению авторов, отражает влияние подготовки образца для испытаний. Таким образом, испытательной лаборатории необходимо строго контролировать условия проведения испытаний и учитывать особенности исследуемого препарата, например гигроскопичность образца или количество препарата в емкости.

Этап 7. Расчет потери в массе при высушивании и представление результатов. Значение показателя «Потеря в массе при высушивании» для двух навесок X_1 и X_2 (в %), рассчитанное по формуле (3), составило:

$$X_1 = \frac{8,3536 - 8,3505}{8,3536 - 8,1538} \times 100\% = 1,55, \quad (14)$$

$$X_2 = \frac{8,4253 - 8,4223}{8,4253 - 8,2252} \times 100\% = 1,50, \quad (15)$$

$$X_{cp} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{n} = \frac{1,55 + 1,50}{2} = 1,53. \quad (16)$$

Таким образом, потеря в массе при высушивании составила $(1,53 \pm 0,34)\%$, где число, следующее за знаком « $\pm$ », является численным значением расширенной неопределенности, которая получена умножением суммарной стандартной

неопределенности на коэффициент охвата $k = 2$, уровень доверия приблизительно 95%.

Расчет неопределенности с использованием доверительного интервала

Основной составляющей неопределенности признается изменчивость в повторных наблюдениях при неизменных условиях измерений – повторяемости. Количественная оценка неопределенности измерений выражается в виде доверительного интервала, вычисленного на основании результатов параллельных измерений. Расчет границ доверительного интервала проводят с использованием значения критерия Стьюдента [5].

При определении потери в массе при высушивании образца использовали данные результатов взвешиваний, приведенные в таблицах 1 и 2. Потерю в массе при высушивании определяли по формуле (3) для каждого измерения отдельно. Далее рассчитывали среднее арифметическое значение (X_{cp}) по формуле (17):

$$X_{cp} = \frac{X_1 + X_2}{n}. \quad (17)$$

Разброс результатов единичных испытаний определяли в виде среднего квадратического (стандартного) отклонения (S) согласно формуле (18):

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{(n - 1)}}. \quad (18)$$

Таблица 3. Бюджет неопределенности методики определения потери в массе при высушивании

Table 3. Uncertainty budget for the analytical procedure for the determination of loss on drying

Измеряемая величина <i>Measurand</i>	Стандартная неопределенность, г <i>Standard uncertainty, g</i>	Коэффициент чувствительности, г ⁻¹ <i>Sensitivity factor, g⁻¹</i>	Вклад в неопределенность, % <i>Contribution to the uncertainty, %</i>
Масса пустого бюкса <i>Mass of an empty bottle</i>	0,00029	7,77	0,003
Масса бюкса с навеской до высушивания <i>Mass of the bottle with the test substance before drying</i>	0,00023	492,74	0,089
Масса бюкса с навеской после высушивания <i>Mass of the bottle with the test substance after drying</i>	0,00029	500,50	0,147

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

Далее рассчитывали доверительный интервал с 95% доверительной вероятностью ($P=95\%$) по формуле (19):

$$(X_{cp} \pm \Delta \bar{X}) = X_{cp} \pm \frac{t_{(\alpha=0,05), (n-1)} \times S}{\sqrt{n}}, \quad (19)$$

где $\alpha=0,05$ — уровень значимости; n — количество измерений, $t_{(p,f)}$ — коэффициент Стьюдента.

Расчет потери в массе при высушивании. Стандартное отклонение S , %, для результатов определения потери в массе при высушивании для двух навесок, рассчитанных по формулам (14–15) $X_1=1,55\%$ и $X_2=1,50\%$ составило согласно формуле (20):

$$S = \sqrt{\frac{(1,55 - 1,53)^2 + (1,50 - 1,53)^2}{(2 - 1)}} = 0,04. \quad (20)$$

Расчет доверительного интервала $\Delta \bar{X}$, %, проводили согласно формуле (21):

$$\Delta \bar{X} = \frac{12,71 \times 0,04}{\sqrt{2}} = 0,32. \quad (21)$$

Таким образом, потеря в массе при высушивании (для двух навесок) с учетом неопределенности составила $1,53 \pm 0,32\%$, где число, следующее за знаком « $\pm$ », является численным значением расширенной неопределенности, которая получена при помощи расчета доверительного интервала с 95% доверительной вероятностью

для числа степеней свободы $f=2-1$ и значения коэффициента критерия Стьюдента $t_{(p,f)}=12,71$.

Расчет неопределенности при помощи подхода «снизу вверх» и с использованием доверительного интервала показал сопоставимые значения: 0,34 и 0,32% соответственно. Таким образом, при определении потери в массе при высушивании в биологических лекарственных препаратах может быть использован метод расчета неопределенности с помощью доверительного интервала как наиболее распространенный и доступный.

Заключение

Рассмотрены факторы, влияющие на неопределенность результатов измерений при определении потери в массе при высушивании в биологических лекарственных препаратах. Два способа расчета неопределенности испытаний показали сопоставимые результаты. Анализ бюджета неопределенности, рассчитанного с использованием подхода «снизу вверх», выявил, что наибольший вклад в результат испытания вносит неопределенность измерения массы бюкса после высушивания, что требует от испытательной лаборатории тщательного контроля процедуры пробоподготовки, учитывающей особенности материала препарата. Для оценки неопределенности может быть использован способ расчета с помощью доверительного интервала.

Литература/References

1. Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы оценки неопределенности методик испытаний и стандартных образцов иммунобиологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(1):27–31. Volkova RA, Fadeikina OV. Estimation of uncertainty of test methods and reference standards used for immunobiological medicines. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(1):27–31 (In Russ.). EDN: [VWOGAY](#)
2. Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы метрологического обеспечения методик оценки качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Стандартные образцы в измерениях и технологиях. Материалы I Международной научной конференции*. Екатеринбург: Уральский научно-исследовательский институт метрологии; 2013. С. 88–90. Volkova RA, Fadeikina OV. Challenges of metrological support of methods for assessing the quality of immunobiologicals. *Reference standards in measurements and technologies. Materials of the 1st International Scientific Conference*. Ekaterinburg: Ural Scientific Research Institute of Metrology; 2013. P. 88–90 (In Russ.). EDN: [SHAGWL](#)
3. Malik KP, Duru C, Ahmed M, Matejtschuk P. Analytical options for the measurement of residual moisture content in lyophilized biological materials. *Am Pharm Rev*. 2010;13(5):42–7.
4. Ворopaев АА, Фадейкина ОВ, Ермолаева ТН, Давыдов ДС. Влияние материала бюксов на воспроизводимость методики определения потери в массе при высушивании. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):208–17. Voropaev AA, Fadeikina OV, Ermolaeva TN, Davydov DS. Influence of the material of weighing bottles on loss-on-drying reproducibility. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):208–17 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-208-217>
5. Glantz SA, ed. *Primer of Biostatistics*. New York: McGraw-Hill; 1992.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **О.В. Фадейкина** — формирование цели и задач исследований, расчет неопределенности, написание текста рукописи; **А.А. Воропаев** — проведение экспериментальных исследований, расчет неопределенности, написание текста рукописи; **Д.С. Давыдов** — консультативная помощь при анализе результатов и оценке состояния проблемы; утверждение окончательной версии статьи для публикации; **Р.А. Волкова** — написание 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. **O.V. Fadeikina** formulated the aim and objectives of the study, calculated uncertainty, and drafted the manuscript. **A.A. Voropaev** conducted experiments, calculated uncertainty, and drafted the manuscript. **D.S. Davydov** provided advisory assistance in analysing the study results and assessing the state of the art, approved the final version of the manuscript for publication. **R.A. Volkova** drafted the manuscript and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

fadeikina@expmed.ru

Воропаев Андрей Андреевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>

voropaev@expmed.ru

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-362>

Davydov@expmed.ru

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

Volkova@expmed.ru

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

fadeikina@expmed.ru

Andrey A. Voropaev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>

voropaev@expmed.ru

Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-362>

Davydov@expmed.ru

Rauza A. Volkova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

Volkova@expmed.ru

Поступила 06.06.2023

После доработки 07.09.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 6 June 2023

Revised 7 September 2023

Accepted 13 September 2023

УДК 615.373:615.07:577.2

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-463-473>

Научно-методическая статья | Scientific methodology article



К вопросу оценки вирусной безопасности индивидуальных единиц субстанции «Плазма человека для фракционирования» методом амплификации нуклеиновых кислот

Е.В. Эльберт[✉], В.В. Ножко, Р.А. Волкова, А.А. Мовсисянц, В.А. Меркулов,
В.В. Косенко

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

✉ Эльберт Елизавета Викторовна; Elbert@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Отсутствие гемотрансмиссивных вирусов в лекарственных препаратах, полученных из плазмы крови человека, должно быть обеспечено контролем исходного сырья и технологией производства.

Цель. Изучение критериев пригодности системы методики при оценке вирусной безопасности индивидуальных единиц субстанции «Плазма человека для фракционирования» в отношении содержания нуклеиновых кислот гемотрансмиссивных вирусов с учетом требований Европейской фармакопеи.

Материалы и методы. Индивидуальные единицы субстанции «Плазма человека для фракционирования» (далее – плазма); международные стандартные образцы (МСО) РНК вируса иммунодефицита человека, вирусов гепатитов А и С (ВГА и ВГС), ДНК вируса гепатита В (ВГВ) и парвовируса В19; наборы реагентов для выявления нуклеиновых кислот указанных вирусов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Результаты. В исследованных образцах плазмы не выявлена РНК ВГС; ДНК парвовируса В19 обнаружена в одном образце плазмы из восьми, концентрация не превышала 10^4 МЕ/мл. Используемые наборы реагентов в трех испытаниях соответствующих МСО позволили выявить РНК ВГС в концентрации 10^2 МЕ/мл, ДНК парвовируса В19 (генотип М1) – 10^4 МЕ/мл. Результаты дополнительных испытаний двух образцов плазмы с учетом требований Европейской фармакопеи при определении РНК ВГС и ДНК парвовируса В19 показали, что новая серия набора реагентов выявляла 10^2 МЕ/мл МСО РНК ВГС только в одном из трех испытаний, что не соответствует заявленной чувствительности набора реагентов. В одном из двух образцов плазмы РНК ВГС не была обнаружена ни в одном испытании с добавлением МСО РНК ВГС до концентрации 10^2 и 10^3 МЕ/мл, возможно, из-за ингибирующих свойств плазмы. В отношении ДНК парвовируса В19 чувствительность наборов реагентов соответствовала заявленной, ингибирующие свойства исследованных образцов плазмы не выявлены.

Выводы. При применении метода ПЦР для оценки вирусной безопасности плазмы, предназначенной для производства препаратов крови, целесообразно использование контрольных образцов, охарактеризованных в МЕ/мл. Для установления критериев пригодности системы методики с их применением необходима разработка соответствующих фармакопейных стандартных образцов.

Ключевые слова: вирусная безопасность; плазма человека для фракционирования; РНК вируса гепатита С; ДНК парвовируса В19; маркеры гемотрансмиссивных вирусов; полимеразная цепная реакция; ПЦР; набор реагентов

© Е.В. Эльберт, В.В. Ножко, Р.А. Волкова, А.А. Мовсисянц, В.А. Меркулов, В.В. Косенко, 2023

Для цитирования: Эльберт Е.В., Ножко В.В., Волкова Р.А., Мовсисянц А.А., Меркулов В.А., Косенко В.В. К вопросу оценки вирусной безопасности индивидуальных единиц субстанции «Плазма человека для фракционирования» методом амплификации нуклеиновых кислот. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):463–473. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-463-473>

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 (с 2021 г.) является главным редактором, А.А. Мовсисянц (с 2001 г.) — членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

On assessing the viral safety of individual units of the substance "Human plasma for fractionation" by nucleic acid amplification

Elizaveta V. Elbert✉, Vitalina V. Nozhko, Rauza A. Volkova, Artashes A. Movsesyants, Vadim A. Merkulov, Valentina V. Kosenko

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

✉ Elizaveta V. Elbert; Elbert@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. The absence of blood-borne viruses in human plasma-derived medicinal products must be ensured by the control of raw materials and the manufacturing process.

Aim. This study aimed to analyse system suitability criteria for analytical procedures to assess the viral safety of individual units of the substance "Human plasma for fractionation" in terms of the content of nucleic acids of blood-borne viruses, considering the requirements of the European Pharmacopoeia.

Materials and methods. The authors analysed individual units of the substance "Human plasma for fractionation" (hereinafter, plasma). The study used the International Standards (ISs) for human immunodeficiency virus RNA, hepatitis A virus (HAV) RNA, hepatitis C virus (HCV) RNA, hepatitis B virus (HBV) DNA, and parvovirus B19 DNA, as well as nucleic acid detection kits for these viruses based on polymerase chain reaction (PCR).

Results. HCV RNA was not detected in any of the eight plasma samples studied, and parvovirus B19 DNA was detected in one of the samples at a concentration not exceeding 10^4 IU/mL. Three tests with the corresponding ISs showed that the studied reagent kits detected HCV RNA at a concentration of 10^2 IU/mL and parvovirus B19 DNA (M1 genotype) at a concentration of 10^4 IU/mL. In additional tests that were conducted in two samples considering the requirements of the European Pharmacopoeia for the detection of HCV RNA and parvovirus B19 DNA, a new batch of reagent kit I detected the HCV RNA IS at a concentration of 10^2 IU/mL only in one of three replicates, which did not correspond to the claimed sensitivity of the reagent kit. HCV RNA was not detected in either replicate in one of two plasma samples spiked with the HCV RNA IS at concentrations of 10^2 and 10^3 IU/mL, possibly because of plasma inhibitory properties. The sensitivity of the reagent kits to parvovirus B19 DNA corresponded to the label claims; the study did not show any inhibitory properties of the plasma samples.

Conclusions. Polymerase chain reaction testing of the viral safety of plasma intended for manufacturing medicinal products should include control samples calibrated in IU/mL. Further research and appropriate pharmacopoeial reference materials are needed to set system suitability criteria for analytical procedures using such control samples.

Key words:

viral safety; human plasma for fractionation; hepatitis C virus RNA; parvovirus B19 DNA; markers of blood-borne viruses; polymerase chain reaction; PCR; reagent kit

For citation: Elbert E.V., Nozhko V.V., Volkova R.A., Movsesyants A.A., Merkulov V.A., Kosenko V.V. On assessing the viral safety of individual units of the substance "Human plasma for fractionation" by nucleic acid amplification. *Biological Products. Prevention, diagnosis, treatment*. 2023;23 (3–1):463–473. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-463-473>

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

Conflict of interest. V.A. Merkulov has been the Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021. A.A. Movsesyants has been a member of the Editorial Board of the journal since 2001. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Препараты, получаемые из плазмы крови человека, должны соответствовать нормативным требованиям по показателю «Вирусная безопасность». В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV)¹, гармонизированными с международными требованиями², как донорская кровь, так и плазма крови человека для фракционирования должны быть свободны от вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2), вирусов гепатитов В и С (ВГВ и ВГС). Подтверждение отсутствия нуклеиновых кислот указанных вирусов в субстанции «Плазма человека для фракционирования» является обязательной мерой минимизации риска вирусной контаминации лекарственных препаратов, получаемых из нее. Данное требование включено в нормативные документы отечественных производителей.

Кроме того, программа тестирования на вирусную безопасность плазмы крови человека, предназначенной для производства препара-

тов крови, дополнительно может включать определение содержания маркеров ряда других вирусов, например в Российской Федерации – РНК вируса гепатита А (ВГА), ДНК парвовируса В19 (в некоторых регионах могут быть включены другие вирусы в зависимости от эпидемиологической обстановки)³; в Европейском союзе – РНК вирусов гепатита А и Е, ДНК парвовируса В19⁴; в США – вируса Западного Нила и парвовируса В19⁵.

Для этих целей в программу тестирования индивидуальных единиц субстанции «Плазма человека для фракционирования», минипулов и производственного пула плазмы дополнительно должна быть включена валидированная методика определения содержания нуклеиновых кислот регламентированных вирусов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), в которой в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV⁶ должна быть описана пробоподготовка и предусмотрены критерии пригодности системы используемой методики⁷ (далее – критерии пригодности системы). В соответствии

¹ ФС.3.3.2.0001.19 Плазма человека для фракционирования. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018 (введена взамен ФС.3.3.2.0001.18 «Плазма человека для фракционирования» приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 185 от 29.03.2019 «Об утверждении общей фармакопейной статьи и фармакопейной статьи»).

ОФС.1.8.1.0007.18 Вирусная безопасность лекарственных препаратов из плазмы крови человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

² Human plasma for fractionation 01/2020:0853. European Pharmacopoeia 11th ed., 2022.

Human plasma (pooled and treated for virus inactivation) 01/2021:1646. European Pharmacopoeia 11th ed., 2022.

USP 41–NF 36 <1180> Human plasma, 2018.

Guideline on plasma-derived medicinal products (EMA/CHMP/BWP/706271/2010). EMA; 2011. https://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/07/WC500109627.pdf

Nucleic acid testing to reduce the possible risk of parvovirus B19 transmission by plasma-derived products. Guidance for Industry. FDA; 2009.

³ ОФС.1.8.1.0007.18 Вирусная безопасность лекарственных препаратов из плазмы крови человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ Human plasma for fractionation 01/2020:0853. European Pharmacopoeia 11th ed., 2022.

Human plasma (pooled and treated for virus inactivation) 01/2021:1646. European Pharmacopoeia 11th ed., 2022.

Guideline on plasma-derived medicinal products (EMA/CHMP/BWP/706271/2010). EMA; 2011. https://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/07/WC500109627.pdf

⁵ USP 41–NF 36 <1180> Human plasma, 2018.

Nucleic acid testing to reduce the possible risk of parvovirus B19 transmission by plasma-derived products. Guidance for Industry. FDA; 2009.

⁶ ОФС.1.7.2.0013.15 Полимеразная цепная реакция. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁷ ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.

с требованиями Европейской фармакопеи (ЕФ)⁸ при использовании метода ПЦР (метода амплификации нуклеиновых кислот) предусмотрены критерии пригодности системы при оценке содержания РНК ВГС и ВГА, ДНК парвовируса В19. Пригодность системы для каждого маркера оценивают с помощью соответствующего контрольного (стандартного) образца, охарактеризованного в международных единицах, МЕ/мл: РНК ВГС, РНК ВГА — в концентрации, равной 10^2 МЕ/мл, ДНК В19 — в концентрации, равной 10^4 МЕ/мл⁹. При этом контрольный (стандартный) образец используется не только как таковой, но и с добавлением до указанной концентрации к испытываемому образцу для оценки эффективности выделения нуклеиновых кислот и/или отсутствия ингибирования реакции.

В Российской Федерации тестирование плазмы доноров на наличие нуклеиновых кислот регламентированных вирусов проводится с использованием валидированной методики с помощью зарегистрированных наборов реагентов для выявления нуклеиновых кислот методом ПЦР с установленной аналитической чувствительностью. В настоящее время в России зарегистрировано около десяти отечественных наборов реагентов различных производителей для выявления нуклеиновых кислот ВГВ, ВГС, ВИЧ, среди которых имеются наборы для одновременного выявления нуклеиновых кислот ВГВ, ВГС, ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Чувствительность этих наборов находится в диапазоне от 5 до нескольких сотен МЕ/мл в зависимости от вида возбудителя или объема анализируемого образца (от 0,2 до 1 мл) и сопоставима с чувствительностью наборов реагентов зарубежного производства.

Для выявления нуклеиновых кислот ВГА и парвовируса В19 в плазме крови в Российской Федерации зарегистрированы наборы реагентов двух отечественных производителей. Результаты исследований по оценке вирусной безопасности плазмы крови в отношении парвовируса В19 и ВГА освещены в российской¹⁰ [1–7] и зарубежной научной литературе [8–10], исследования проводятся также и в отношении РНК ВГС и других вирусов [11–14].

Для контроля субстанции «Плазма человека для фракционирования» по показателю качества «Вирусная безопасность» допускается возможность использования любых зарегистрированных наборов реагентов для проведения ПЦР без конкретизации условий их применения, например, объема анализируемого образца. В отечественных наборах реагентов предусмотрена оценка пригодности системы с использованием положительного контрольного образца и внутреннего контрольного образца, однако концентрация этих контрольных образцов не охарактеризована в международных единицах (МЕ/мл). В инструкции по применению наборов реагентов не указано использование контрольного образца с определенной концентрацией в МЕ/мл; необходимые для этих целей фармакопейные стандартные образцы отсутствуют. В связи с этим исследование методических подходов к оценке вирусной безопасности плазмы крови для фракционирования методом амплификации нуклеиновых кислот с использованием критериев пригодности системы является актуальным.

Цель работы — изучение критериев пригодности системы при оценке вирусной безопасности индивидуальных единиц субстанции «Плазма человека для фракционирования» в отношении содержания нуклеиновых кислот гемотрансмиссивных вирусов с учетом требований Европейской фармакопеи.

Задачей исследования являлось изучение критериев пригодности системы на примере выявления РНК ВГС и ДНК парвовируса В19 при использовании отечественных наборов реагентов для определения нуклеиновых кислот методом ПЦР и международных стандартных образцов РНК ВГС и ДНК парвовируса В19, охарактеризованных в международных единицах (МЕ/мл).

Материалы и методы

Материалы:

- индивидуальные единицы субстанции «Плазма человека для фракционирования» (далее — плазма), предназначенной для производства препаратов крови — 8 образцов;

⁸ Human plasma (pooled and treated for virus inactivation) 01/2021:1646. European Pharmacopoeia 11th ed., 2022.

⁹ Там же.

¹⁰ Попцов АЛ. Значение индикации ДНК парвовируса В19 в обеспечении инфекционной безопасности плазмы для фракционирования: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Киров; 2015.

Зубкова НВ. Биотехнологические аспекты вирусной безопасности препаратов иммуноглобулинов: Методология, производство, стандартизация: автореф. дис. ... д-ра фарм. наук. Пермь; 2012.

Парамонов ИВ. Система обеспечения качества и инфекционной безопасности плазмы для фракционирования в условиях ее массовой заготовки: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Киров; 2017.

- образцы сыворотки, использованные для разведения международных стандартных образцов (МСО); образцы сыворотки предварительно проверены на отсутствие РНК ВГС и ВГА, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, ДНК вируса ВГВ и парвовируса В19 с помощью указанных далее наборов реагентов;
 - нормальная сыворотка крови человека (компонент отраслевого стандартного образца – ОСО 42-28-77, ФСО 3.1.00077 стандартный образец тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза) производства ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»;
 - контрольная сыворотка Kemtrol, норма (Kemtrol Serum Control–Normal Kit, Helena BioSciences Europe, Великобритания, артикул 7024).
- В работе использовали наборы реагентов для выявления нуклеиновых кислот гемотрансмиссивных вирусов в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.
1. Наборы реагентов для одновременного выявления РНК ВГС, ДНК ВГВ и РНК ВИЧ:
- набор реагентов «АмплиСенс HCV/HBV/HIV-FL» производства ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия (кат. № TR-V62-Ms (RG,Dt)); аналитическая чувствительность: 50 МЕ/мл ВГС, 25 МЕ/мл ВГВ, 100 копий/мл ВИЧ-1, 300 копий/мл ВИЧ-2 – при объеме исследуемого материала 0,2 мл; 10 МЕ/мл ВГС, 5 МЕ/мл ВГВ, 20 копий/мл ВИЧ-1, 60 копий/мл ВИЧ-2 при объеме исследуемого материала 1,0 мл (набор реагентов I);
 - набор реагентов «РеалБест ВГВ/ВГС/ВИЧ ПЦР» производства АО «Вектор-Бест», Россия (кат. № D-0592); аналитическая чувствительность: 10 МЕ/мл ВГВ, 15 МЕ/мл ВГС, 30 МЕ/мл ВИЧ-1, 50 МЕ/мл ВИЧ-2 при объеме исследуемого материала 1,0 мл (набор реагентов II).
2. Наборы реагентов для выявления РНК ВГА:
- набор реагентов «АмплиСенс HAV-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия (кат. № R-V4(RG,iQ)); аналитическая чувствительность при объеме образца 0,2 мл – 250 копий/мл; объеме 1,0 мл – 50 копий/мл (набор реагентов III);
 - набор реагентов «РеалБест РНК ВГА» производства АО «Вектор-Бест», Россия (кат. № D-0398);
- аналитическая чувствительность при объеме образца 1,0 мл – 50 копий/мл (набор реагентов IV).
3. Наборы реагентов для выявления ДНК парвовируса В19:
- набор реагентов «АмплиСенс Parvovirus B19-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия (кат. № R-V49 (RG, iQ, Mx)); аналитическая чувствительность при выявлении ДНК: 360 МЕ/мл, при количественном определении линейный диапазон измерения 720–9000000 МЕ/мл (набор реагентов V);
 - набор реагентов «РеалБест ДНК Parvovirus B19» производства АО «Вектор-Бест», Россия (кат. № D-2801); аналитическая чувствительность не указана (набор реагентов VI).
- В работе использовались следующие Международные стандартные образцы (МСО):
- МСО ВГВ для метода амплификации нуклеиновых кислот (3rd WHO International standard for hepatitis B virus for nucleic acid amplification techniques, NIBSC code: 10/264) (далее – МСО ДНК ВГВ);
 - МСО ВГС для метода амплификации нуклеиновых кислот (4th WHO International standard for hepatitis C virus for nucleic acid amplification techniques, NIBSC code: 06/102) (далее – МСО РНК ВГС 06/102);
 - МСО ВГС для метода амплификации нуклеиновых кислот (6th WHO International standard for hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques, NIBSC code: 18/184) (далее – МСО РНК ВГС 18/184);
 - МСО ВИЧ-1 для метода амплификации нуклеиновых кислот (HIV-1 International standard, NIBSC code: 10/152) (далее – МСО РНК ВИЧ-1);
 - МСО ВГА для метода амплификации нуклеиновых кислот (2nd WHO International standard for hepatitis A virus for nucleic acid amplification techniques, NIBSC code: 00/562) (далее – МСО РНК ВГА);
 - международная референс-панель генотипов парвовируса В19 для метода амплификации нуклеиновых кислот (1st WHO international reference panel for Parvovirus B19 genotypes for NAT-based assays, NIBSC code: 09/110) (далее – референс-панель генотипов);
 - МСО парвовируса В19 для метода амплификации нуклеиновых кислот (3rd WHO International standard for Parvovirus B19 for nucleic acid amplification techniques, NIBSC code: 12/208) (далее – МСО ДНК В19);
 - референс-панель с низким содержанием контрольных материалов ВГС, ВГВ и ВИЧ для метода амплификации нуклеиновых кислот (CE Marked Material HBV, HCV and HIV

Multiplex 14/198-XXX, NIBSC code: 14/198-XXX), концентрация нуклеиновых кислот в инструкции не указана¹¹.

Оборудование:

- амплификатор Real-Time CFX96 Touch (BioRad, США);
- программное обеспечение CFX Manager (BioRad, США).

Методы

ПЦР проводили в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов реагентов, в которых предусмотрены собственные положительный контрольный образец (ПКО) и внутренний контрольный образец (ВКО) для оценки эффективности выделения или ингибирования реакции; однако характеристика образцов в МЕ/мл не приведена, концентрация данных образцов при проведении ПЦР не указана. В связи с этим одновременно с образцами плазмы в качестве дополнительного положительного контроля оценивали МСО, которые предварительно разводили до концентрации 10^5 МЕ/мл, а затем готовили необходимые разведения с концентрацией 10^4 , 10^3 и 10^2 МЕ/мл (10^3 и 10^2 МЕ/мл для РНК ВГС; 10^2 МЕ/мл для РНК ВГА, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, ДНК ВГВ; 10^3 и 10^4 МЕ/мл для ДНК парвовируса В19). Для приготовления указанных разведений МСО использовали образцы сыворотки крови человека, предварительно проверенные на отсутствие РНК/ДНК гемотрансмиссивных вирусов.

В испытаниях для выявления РНК ВГС использовали наборы реагентов для одновременного выявления нуклеиновых кислот ВИЧ, ВГВ и ВГС, в связи с чем использовали также МСО РНК ВИЧ-1 и МСО ДНК ВГВ. Для приготовления образцов плазмы с добавлением МСО РНК ВГС или МСО ДНК парвовируса В19 соответствующие МСО разводили до нужной концентрации испытуемыми образцами плазмы. Разведения МСО и образцы плазмы анализировали в трех повторностях.

В соответствии с инструкциями по применению наборов реагентов в исследуемых образцах результат ПЦР признавали положительным, если значение показателя порогового цикла ПЦР

(Ct) было менее 40, результат признавали отрицательным, если $Ct > 40$ или отсутствует (предел указан производителем во вкладышах, прилагаемых к наборам реагентов). Результаты ПЦР учитывали, если выполнялись критерии для оценки контрольных образцов производителя набора реагентов (указаны производителем во вкладышах, прилагаемых к наборам реагентов).

Для представления результатов исследования в таблицах использовались данные не количественного анализа.

Результаты и обсуждение

Показано, что все использованные наборы реагентов для проведения ПЦР выявляют ДНК/РНК ВГВ, ВГА, ВГС, ВИЧ-1 в образцах МСО с концентрацией 10^2 МЕ/мл и ДНК вируса В19 в образцах МСО с концентрацией 10^4 МЕ/мл (табл. 1).

В отношении ДНК парвовируса В19 были проведены испытания референс-панели генотипов парвовируса В19, результаты которых показали, что два набора реагентов для проведения ПЦР выявляют парвовирус В19 только генотипа М1: набор реагентов V определяет вирус в концентрации 10^3 и 10^4 МЕ/мл, набор реагентов VI – в концентрации 10^4 МЕ/мл, два других генотипа (М2 и М3) оба набора реагентов не выявили. Полученные результаты согласуются с данными научной литературы [1–5], при этом все три генотипа могут быть обнаружены зарегистрированным в Российской Федерации набором реагентов Cobas® TaqScreen DPX Test (Roche)¹².

Далее проводили анализ восьми образцов плазмы с использованием наборов реагентов одного производителя (табл. 2). Результаты испытаний на выявление РНК ВГА не включены в таблицу 2, так как были проведены только на трех образцах плазмы (№ 1–3), в которых РНК ВГА не была определена.

Было показано, что РНК ВГС, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, ДНК ВГВ не выявлены во всех восьми образцах плазмы (№ 1–8). ДНК парвовируса В19 обнаружена в одном из 8 образцов в концентрации, не превышающей 10^4 МЕ/мл (Ct по каналу HEX (Parvovirus В19) для МСО 10^4 МЕ/мл – 14,86, для образца плазмы № 3 – 32,41).

С двумя образцами плазмы (№ 6 и 7) дополнительно были проведены испытания в соответствии

¹¹ <https://www.nibsc.org/documents/ifu/14-198-xxx.pdf>

¹² Попцов АЛ. Значение индикации ДНК парвовируса В19 в обеспечении инфекционной безопасности плазмы для фракционирования: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Киров; 2015.

Зубкова НВ. Биотехнологические аспекты вирусной безопасности препаратов иммуноглобулинов: Методология, производство, стандартизация: автореф. дис. ... д-ра фарм. наук. Пермь; 2012.

Парамонов ИВ. Система обеспечения качества и инфекционной безопасности плазмы для фракционирования в условиях её массовой заготовки: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Киров; 2017.

Таблица 1. Анализ международных стандартных образцов (МСО) РНК/ДНК вирусов гепатитов В (ВГВ), С (ВГС), А (ВГА), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), парвовируса В19 (В19) с использованием наборов реагентов I–VI двух производителей для выявления нуклеиновых кислот методом ПЦР

Table 1. Analysis of International Standards (ISs) for RNA/DNA of hepatitis A virus (HAV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), human immunodeficiency virus (HIV-1), and parvovirus B19 (B19) using reagent kits I–VI for nucleic acid detection by polymerase chain reaction (PCR) from two manufacturers

Наименование МСО <i>IS name</i>	Концентрация нуклеиновой кислоты в образце (МЕ/мл) <i>Nucleic acid concentration in the sample (IU/mL)</i>	Результат ПЦР с использованием набора реагентов <i>PCR results using</i>	
		Набор реагентов I <i>Reagent kit I</i>	Набор реагентов II <i>Reagent kit II</i>
МСО ДНК ВГВ <i>HBV DNA IS</i>	10 ²	+++	+++
МСО РНК ВГС 06/102 <i>HCV RNA IS 06/102</i>	10 ²	+++	+++
МСО РНК ВГС 18/184 <i>HCV RNA IS 18/184</i>	10 ³	+++	+++
	10 ²	+++	H. o. / N. d.
	10 ³	+++	H. o. / N. d.
МСО РНК ВИЧ-1 <i>HIV-1 RNA IS</i>	10 ²	+++	+++
		Набор реагентов III <i>Reagent kit III</i>	Набор реагентов IV <i>Reagent kit IV</i>
МСО РНК ВГА <i>HAV RNA IS</i>	10 ²	+++	+++
		Набор реагентов V <i>Reagent kit V</i>	Набор реагентов VI <i>Reagent kit VI</i>
МСО ДНК В19 <i>B19 DNA IS</i>	10 ³	+++	---
	10 ⁴	+++	+++

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

Примечание. Представлены результаты проведения ПЦР в трех повторностях. «+» — положительный результат ПЦР в одном испытании; «-» — отрицательный результат ПЦР в одном испытании; Н. о. — не определяли.

Note. The table presents the results of PCR tests in three replicates. +, positive PCR result in one replicate; -, negative PCR result in one replicate; N. d., not determined.

Таблица 2. Выявление нуклеиновых кислот вирусов гепатитов В (ВГВ) и С (ВГС), вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2), парвовируса В19 (В19) в образцах плазмы с использованием наборов реагентов I и V

Table 2. Detection of nucleic acids of hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), human immunodeficiency virus (HIV-1, HIV-2), and parvovirus B19 (B19) in plasma samples using reagent kits I and V

Номер образца плазмы <i>Plasma sample No.</i>	Результат ПЦР с использованием набора реагентов <i>PCR results using</i>				
	Набор реагентов I <i>Reagent kit I</i>				Набор реагентов V <i>Reagent kit V</i>
	Выявляемый маркер <i>Detectable marker</i>				
	ДНК ВГВ <i>HBV DNA</i>	РНК ВГС <i>HCV RNA</i>	РНК ВИЧ-1 <i>HIV1 RNA</i>	РНК ВИЧ-2 <i>HIV2 RNA</i>	ДНК В19 <i>B19 DNA</i>
1, 2, 4–8	---	---	---	---	---
3	---	---	---	---	+++ (<10 ⁴)

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

Примечание. Представлены результаты проведения ПЦР в трех повторностях. «+» — положительный результат ПЦР в одном испытании; «-» — отрицательный результат ПЦР в одном испытании.

Note. The table presents the results of PCR tests in three replicates. +, positive PCR result in one replicate; -, negative PCR result in one replicate.

с требованиями ЕФ¹³ в отношении выявления РНК ВГС и ДНК В19, для чего одновременно с образцами плазмы проводили испытания МСО и образцов плазмы с добавлением соответствующих МСО. Для определения РНК ВГС использовали в качестве дополнительного положительного контроля МСО РНК ВГС в концентрации 10² МЕ/мл и 10³ МЕ/мл, а также образцы плазмы с добавлением МСО РНК ВГС до той же концентрации в качестве дополнительного контроля эффективности выделения или отсутствия ингибирования реакции (табл. 3).

В образце плазмы № 6 с добавлением МСО РНК ВГС (табл. 3) целевая РНК не была выявлена даже в концентрации 10³ МЕ/мл, то есть в данной плазме могут присутствовать компоненты, оказывающие влияние на эффективность выделения РНК ВГС или ингибирующие реакцию, хотя соответствующие контрольные образцы из набора реагентов (ВКО и ПКО) это не обнаружили.

Результаты исследования показали, что использованная для получения данных таблицы 3 серия набора реагентов I как в образцах с разведениями МСО, так и в образце плазмы № 7 с добавленным МСО выявила РНК ВГС в трех испытаниях только в концентрации 10³ МЕ/мл; концентрация 10² МЕ/мл была определена только в одном из трех испытаний в отличие от результатов, полученных с МСО ранее с другой серией набора реагентов (табл. 1). Следовательно, чувствительность данной серии набора I не соответствует заявленной (аналитическая чувствительность должна составлять 10 МЕ/мл

при использовании 1 мл образца). В связи с этим провели испытание референс-панели с низким содержанием контрольных материалов ВГС, ВГВ и ВИЧ для ПЦР (концентрация нуклеиновых кислот в референс-панели не указана) с данной серией набора (табл. 4).

РНК ВГС выявлена только в одной повторности из трех; ДНК ВГВ выявлена во всех трех повторностях; РНК вируса ВИЧ не определена ни в одной повторности (табл. 4). Представленные данные могут служить подтверждением невозможности использования данной серии набора реагентов для обнаружения низкого содержания РНК ВГС из-за несоответствия заявленной чувствительности в отношении РНК ВГС, что делает актуальным контроль наборов реагентов для выявления нуклеиновых кислот трансмиссивных вирусов с использованием стандартных образцов, охарактеризованных в МЕ/мл, и проведение дальнейших исследований для установления критериев пригодности системы в МЕ/мл.

Результаты испытания образцов плазмы № 6 и 7 с МСО ДНК парвовируса В19 в концентрации 10³–10⁴ МЕ/мл, проведенные с набором реагентов V, представлены в таблице 5.

ДНК парвовируса В19 выявляется набором реагентов V с одинаковой эффективностью в концентрации 10³–10⁴ МЕ/мл как в МСО ДНК парвовируса В19, так и в присутствии образцов плазмы (табл. 5), то есть чувствительность данной серии набора соответствует заявленной и исследованные образцы плазмы не влияют

Таблица 3. Выявление РНК вируса гепатита С (ВГС) в образцах плазмы с учетом требований Европейской фармакопеи с использованием набора реагентов I

Table 3. Detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in plasma samples using reagent kit I, taking into account the requirements of the European Pharmacopoeia

Выявление РНК ВГС в образцах плазмы <i>Detection of HCV RNA in plasma samples</i>		Выявление РНК ВГС в образцах плазмы с добавлением МСО РНК ВГС 18/184 в концентрации <i>Detection of HCV RNA in plasma samples spiked with HCV RNA IS 18/184 at a concentration of</i>		Выявление РНК ВГС в МСО РНК ВГС 18/184 в концентрации <i>Detection of HCV RNA in HCV RNA IS 18/184 at a concentration of</i>	
Номер образца плазмы <i>Plasma sample No.</i>	Результат ПЦР <i>PCR result</i>	МЕ/мл <i>IU/mL</i>	Результат ПЦР <i>PCR result</i>	МЕ/мл <i>IU/mL</i>	Результат ПЦР <i>PCR result</i>
6	— — —	1000	— — —	1000	+ + +
		100	— — —		
7	— — —	1000	+ + +	100	+ — —
		100	+ — —		

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

Примечание. Представлены результаты проведения ПЦР в трех повторностях. «+» — положительный результат ПЦР в одном испытании; «—» — отрицательный результат ПЦР в одном испытании. МСО — международный стандартный образец.

Note. The table presents the results of PCR tests in three replicates. +, positive PCR result in one replicate; —, negative PCR result in one replicate. IS, International Standard.

¹³ Human plasma (pooled and treated for virus inactivation) 01/2021:1646. European Pharmacopoeia 11th ed., 2022.

Таблица 4. Выявление нуклеиновых кислот в референс-панели с низким содержанием контрольных материалов вирусов гепатита С (ВГС), гепатита В (ВГВ) и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2) с использованием набора реагентов I для выявления нуклеиновых кислот методом ПЦР

Table 4. Detection of nucleic acids in a reference panel of low positive control samples of hepatitis C virus (HCV), hepatitis B virus (HBV), and human immunodeficiency virus (HIV-1, HIV-2) using reagent kit I for nucleic acid detection by PCR

Наименование МСО <i>IS name</i>	Результаты ПЦР <i>PCR results</i>			
	Маркер вируса <i>Virus marker</i>			
	ДНК ВГВ <i>HBV DNA</i>	РНК ВГС <i>HCV RNA</i>	РНК ВИЧ-1 <i>HIV-1 RNA</i>	РНК ВИЧ-2 <i>HIV-2 RNA</i>
Референс-панель с низким содержанием РНК/ДНК ВГВ, ВГС, ВИЧ (Multiplex 14/198-XXX) <i>Low positive controls: RNA/DNA of HBV, HCV, and HIV (Multiplex 14/198-XXX)</i>	+++	+ --	---	---

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

Примечание. Представлены результаты проведения ПЦР в трех повторностях. «+» — положительный результат ПЦР в одном испытании; «-» — отрицательный результат ПЦР в одном испытании. МСО — международный стандартный образец.

Note. The table presents the results of PCR tests in three replicates. +, positive PCR result in one replicate; -, negative PCR result in one replicate. IS, International Standard.

на эффективность выделения и не ингибируют реакцию. Таким образом, в отношении ДНК парвовируса B19, в отличие от РНК ВГС, чувствительность наборов реагентов соответствовала заявленной, ингибирующие свойства исследованных образцов плазмы не обнаружены.

Анализ результатов проведенного исследования показал, что в восьми исследованных образцах плазмы с применением использованных наборов реагентов не выявлена РНК ВГС, а ДНК парвовируса B19 определена в одном образце плазмы из восьми (концентрация не превышала 10^4 МЕ/мл). При анализе соответствующих МСО использованные наборы реагентов в трех

испытаниях позволили выявить РНК ВГС в концентрации 10^2 МЕ/мл и ДНК парвовируса B19 (генотип M1) в концентрации 10^4 МЕ/мл.

Результаты испытаний двух образцов плазмы, проведенные дополнительно с учетом требований ЕФ при определении РНК ВГС и ДНК B19, показали, что с применением новой серии набора реагентов при выявлении РНК ВГС в МСО выявлена концентрация 10^2 МЕ/мл только в одном из трех испытаний, что не соответствует заявленной чувствительности набора реагентов. Кроме того, в одном из двух образцов плазмы РНК ВГС не была обнаружена ни в одном испытании с добавлением МСО РНК ВГС (до концентрации

Таблица 5. Выявление ДНК парвовируса B19 (B19) в образцах плазмы с учетом требований Европейской Фармакопеи с использованием набора реагентов V

Table 5. Detection of parvovirus B19 (B19) DNA in plasma samples using reagent kit V, taking into account the requirements of the European Pharmacopoeia

Выявление ДНК B19 в образцах плазмы <i>Detection of B19 DNA in plasma samples</i>		Выявление ДНК B19 в образцах плазмы с добавлением МСО ДНК B19 в концентрации <i>Detection of B19 DNA in plasma samples spiked with B19 RNA IS at a concentration of</i>		Выявление ДНК B19 в МСО ДНК B19 в концентрации <i>Detection of B19 DNA in B19 RNA IS at a concentration of</i>	
Номер образца плазмы <i>Plasma sample No.</i>	Результат ПЦР <i>PCR result</i>	МЕ/мл <i>IU/mL</i>	Результат ПЦР <i>PCR result</i>	МЕ/мл <i>IU/mL</i>	Результат ПЦР <i>PCR result</i>
6	---	10000	+++	10000	+++
		1000	+++		
7	---	10000	+++	1000	+++
		1000	+++		

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

Примечание. Представлены результаты проведения ПЦР в трех повторностях. «+» — положительный результат ПЦР в одном испытании; «-» — отрицательный результат ПЦР в одном испытании. МСО — международный стандартный образец.

Note. The table presents the results of PCR tests in three replicates. +, positive PCR result in one replicate; -, negative PCR result in one replicate. IS, International Standard.

10² и 10³ МЕ/мл), что, возможно, связано с ингибирующими свойствами плазмы. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования контрольных образцов, охарактеризованных в международных единицах (МЕ/мл), при оценке вирусной безопасности.

Заключение

При применении метода ПЦР для оценки индивидуальных единиц субстанции «Плазма

человека для фракционирования», предназначенной для производства препаратов крови, по показателю качества «Вирусная безопасность» целесообразно использование контрольных образцов, охарактеризованных в международных единицах МЕ/мл. Для установления критериев пригодности системы с их применением необходимо продолжение исследований и разработка соответствующих фармакопейных стандартных образцов.

Литература/References

1. Попцов АЛ, Парамонов ИВ, Фетищева НЮ. Верификация методики выявления и количественного определения ДНК парвовируса В19 методом ПЦР в плазме для фракционирования. *Вестник Службы крови России*. 2014;(1):48–53. Poptsov AL, Paramonov IV, Fetishcheva NYu. Verification of the method for calculating and determining the amount of parvovirus B19 DNA by PCR in plasma for fractionation. *Bulletin of the Blood Service of Russia*. 2014;(1):48–53 (In Russ.). EDN: [SACMUR](#)
2. Филатова ЕВ, Зубкова НВ, Новикова НА, Голицына ЛН, Кузнецов КВ. Определение маркеров парвовируса В19 в образцах крови доноров. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010;(5):67–70. Filatova EV, Zubkova NV, Novikova NA, Golitsyna LN, Kuznetsov KV. Determination of parvovirus B19 markers in blood samples from donors. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2010;(5):67–70 (In Russ.). EDN: [VYZOAF](#)
3. Филатова ЕВ, Зубкова НВ, Короткова ТВ, Гальговская СА, Анастасиев ВВ. Оценка изменения концентрации ДНК парвовируса В19 при модельном фракционировании плазмы крови доноров. *Гематология и трансфузиология*. 2011;56(3):10–4. Filatova EV, Zubkova NV, Korotkova TV, Galgovskaya SA, Anastasiev VV. Implication of changes in the concentration of parvovirus B19 DNA for model fractionation of donor plasma. *Hematology and Transfusiology*. 2011;56(3):10–4 (In Russ.). EDN: [NWGNUF](#)
4. Зубкова НВ, Казьянин АВ, Николаева АМ, Лаптева ЛК, Силин ЕВ. Алгоритм входного контроля вирусной безопасности сырья для производства лечебных препаратов из плазмы крови доноров. *Гематология и трансфузиология*. 2012;57(1):9–13. Zubkova NV, Kazyanin AV, Nikolaeva AM, Lapteva LK, Silin EV. Development of virus safety control algorithm for the manufacture of donor plasma products. *Hematology and Transfusiology*. 2012;57(1):9–13 (In Russ.). EDN: [PEVZSL](#)
5. Зубкова НВ. Обеспечение инфекционной безопасности препаратов из плазмы крови доноров. *Гематология и трансфузиология*. 2014;59(2):44–9. Zubkova NV. Infection safety of donor plasma preparations. *Hematology and Transfusiology*. 2014;59(2):44–9 (In Russ.). EDN: [SNTITVT](#)
6. Парамонов ИВ, Попцов АЛ, Кудашева ЭЮ. Алгоритм исследования плазмы для фракционирования на наличие РНК вируса гепатита А. *Трансфузиология*. 2016;17(4):71–7. Paramonov IV, Poptsov AL, Kudasheva EYu. Plasma for fractionation essay for RNA of hepatitis a virus algorithm. *Transfusiology*. 2016;17(4):71–7 (In Russ.). EDN: [ZHKLUV](#)
7. Останкова ЮВ, Хамитова ИВ, Лаврентьева ИН, Семенов АВ. Способ выявления в биологическом материале ДНК вируса парвовирус В19 на основе двухэтапной ПЦР. Патент Российской Федерации № 2753310; 2019. Ostankova YuV, Khamitova IV, Lavrentieva IN, Semenov AV. Method for detecting parvovirus B19 in DNA biological material based on two-step PCR. Patent of the Russian Federation No. 2753310; 2019 (In Russ.). EDN: [AOLCQJ](#)
8. Zou W, Wang Z, Xiong M, Chen AY, Xu P, Ganaie SS, et al. Human parvovirus B19 utilizes cellular DNA replication machinery for viral DNA replication. *J Virol*. 2018;92(5):e01881-17. <https://doi.org/10.1128/jvi.01881-17>
9. Taconet L, Seifner A, Baylis SA, Chudy M, Kreß J, Mathys E, et al. Detection of hepatitis C virus and parvovirus B19 in human plasma pools by nucleic acid amplification techniques – Trends in results of EDQM proficiency testing studies from 2004 to 2018. *Biologicals*. 2021;71:9–19. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2021.04.004>
10. Toppinen M, Norja P, Aaltonen L-M, Wessberg S, Hedman L, Söderlund-Venermo M, Hedman K. A new quantitative PCR for human parvovirus B19 genotypes. *J Virol Methods*. 2015;218:40–5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.03.006>
11. Игнатова ЕН, Туполева ТА, Овчинникова ЕН, Романова ТЮ, Ярославцева НГ, Филатов ФП и др. Влияние современных подходов к лабораторному обследованию доноров крови и ее компонентов на инфицированность вирусом гепатита В у больных с заболеваниями системы крови. *Терапевтический архив*. 2017;89(11):27–34. Ignatova EN, Tupoleva TA, Ovchinnikova EN, Romanova TYu, Yaroslavtseva NG, Filatov FP, et al. Impact of current approaches to laboratory screening of donated blood and its components on hepatitis b virus infection in patients with blood system diseases. *Therapeutic Archive*. 2017;89(11):27–34 (In Russ.). EDN: [ZWQSNR](#)

12. Бердюгина ОВ. Выявляемость нуклеиновых кислот вирусов гепатитов В и С методом ПЦР в рутинной клинической практике. В кн.: *Молекулярная диагностика. Сборник трудов*. Т. 1. М.: Юлис; 2021. С. 15–6.
Berdyugina OV. Detection of nucleic acids of hepatitis B and C viruses by PCR in routine clinical practice. In: *Molecular Diagnostics. Proceedings*. V. 1. Moscow: Yulis; 2021. P. 15–6 (In Russ.).
EDN: [EZEXKA](#)
13. O'Brien SF, Yi QL, Fan W, Scalia V, Goldman M, Fearon MA. Residual risk of HIV, HCV and HBV in Canada. *Transfus Apher Sci*. 2017;56(3):389–91.
<https://doi.org/10.1016/j.transci.2017.03.010>
14. Ha J, Park Y, Kim HS. Evaluation of clinical sensitivity and specificity of hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus, and human immunodeficiency Virus-1 by cobas MPX: Detection of occult HBV infection in an HBV-endemic area. *J Clin Virol*. 2017;96:60–3.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.09.010>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Эльберт** — выполнение экспериментальных работ, обработка полученных данных, обсуждение результатов исследования, написание текста рукописи; **В.В. Ножко** — выполнение экспериментальных работ и обработка полученных данных, обсуждение результатов исследования; **Р.А. Волкова** — формирование задач исследования, планирование эксперимента, обсуждение результатов исследования, написание и редактирование текста рукописи; **А.А. Мовсисянц** — обсуждение результатов исследования; **В.А. Меркулов** — дизайн исследования, обсуждение результатов; **В.В. Косенко** — утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Elbert** conducted experiments, processed the experimental data, discussed the study results, and drafted the manuscript. **V.V. Nozhko** conducted experiments, processed the experimental data, and discussed the study results. **R.A. Volkova** formulated the study objectives, designed the experiments, discussed the study results, and edited the manuscript. **A.A. Movsesyants** discussed the study results. **V.A. Merkulov** designed the study and discussed the study results. **V.V. Kosenko** approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Эльберт Елизавета Викторовна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2737-948X>
Elbert@expmed.ru

Ножко Виталина Витальевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2617-1479>
MichailovaVV@expmed.ru

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>
Volkova@expmed.ru

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

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

Косенко Валентина Владимировна, канд. фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
kosenko@expmed.ru

Elizaveta V. Elbert, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2737-948X>
Elbert@expmed.ru

Vitalina V. Nozhko
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2617-1479>
MichailovaVV@expmed.ru

Rauza A. Volkova, Dr. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>
Volkova@expmed.ru

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

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

Valentina V. Kosenko, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
kosenko@expmed.ru

Поступила 03.04.2023

После доработки 18.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 3 April 2023

Revised 18 August 2023

Accepted 13 September 2023

Уважаемые читатели!

С целью расширения и укрепления научной коммуникации между представителями фармсообщества и специализированными СМИ 14 ноября 2023 г. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России проводит круглый стол на тему «Отражение вопросов разработки, экспертизы и регистрации лекарственных средств в научных СМИ фармацевтического и медицинского профиля».

Мероприятие будет проводиться в рамках научно-практической конференции [«Регуляторная практика и регистрация лекарственных средств»](#) («РегЛек-2023», 13–15 ноября 2023 г.).

Темы для обсуждения:

- актуальные вопросы редакционной политики научного периодического издания (на примере журналов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России);
- потенциальный чек-лист на соответствие рукописи лучшим редакционно-этическим практикам;
- возможности электронной платформы Elpub по обработке и представлению научной информации;
- отраслевое СМИ как площадка для диалога регуляторов и специалистов фармотрасли;
- платформа для взаимодействия с аптечными организациями, осуществляющими изготовление лекарственных препаратов;
- возможности СМИ для коммуникационного взаимодействия по вопросам экспертизы и регистрации лекарственных средств по процедуре ЕАЭС.

К участию в круглом столе приглашаются главные (ответственные) редакторы журналов медицинского и фармацевтического профиля, заместители директоров по науке крупных отечественных фармпредприятий, эксперты – авторы научных статей.

Дата проведения: 14 ноября (вторник) с 15:30 до 17:00.

Место проведения: г. Москва, отель «Хаятт Ридженси Москва Петровский Парк» (Ленинградский проспект, 36, стр. 33).

Для участия в круглом столе необходимо направить заявку по электронной почте fedotovaof@expmed.ru



ISSN 2221-996X



9 772221 996004