

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

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Том / Volume

№ / No.

24

1

2024

ТЕМА НОМЕРА

**Стандартизация
и контроль качества
биологических
лекарственных препаратов**

www.biopreparations.ru



Уважаемые коллеги!

29 августа 1918 года в книге контроля вакцин Центральной контрольной станции сывороток и вакцин была сделана первая запись о проконтролированном препарате. Объектом контроля стали вакцины против кишечных инфекций. С этого времени начинается история профессионального контроля медицинских иммунобиологических препаратов в России.

Более чем 100-летняя система и практика контроля качества биологических лекарственных препаратов находит отражение в данном тематическом выпуске журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Представленные в журнале статьи касаются различных направлений прикладных научных исследований в области стандартизации и контроля качества биологических лекарственных препаратов — разработки и аттестации фармакопейных стандартных образцов, анализа существующих методов и методик контроля, поиска и разработки альтернативных методов контроля качества с использованием современного высокотехнологичного оборудования.

Обеспечение высокого качества биологических лекарственных средств во многом зависит от применения стандартных образцов. В этом аспекте представлено исследование по разработке и аттестации фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности рекомбинантного интерферона α -2b, который из-за отсутствия международного стандарта может рассматриваться как первичный отечественный стандартный образец. На основе анализа международных и отечественных требований к стандартным образцам разработаны рекомендации по формированию материалов раздела по стандартным образцам в регистрационных досье на биологические лекарственные препараты (методики, валидационные характеристики методик, установление значений аттестованных характеристик стандартного образца, стабильность и др.). Проведение подобных исследований в современных условиях логистических ограничений и политико-экономических санкций, безусловно, будет способствовать развитию независимой от импортозамещения системы стандартизации — создания национального банка первичных фармакопейных стандартных образцов.

Обеспечение эффективного контроля качества лекарственных средств основывается также на внедрении в практику новых и усовершенствованных инструментальных методов исследований, таких как метод масс-спектрометрии, унифицированная методика иммуноферментного анализа и др. Статьи на эту тему также опубликованы в данном выпуске журнала.

Все статьи данного номера представляют несомненный научный интерес и будут способствовать совершенствованию системы стандартизации и контроля качества биологических лекарственных средств.

С уважением,
доктор медицинских наук, профессор

МОВСЕСЯНЦ Арташес Авакович

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

ТОМ 24, № 1, 2024

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

Учредитель:

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

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

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ 0,980.

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 24, NO. 1, 2024

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

Founder:

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

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

The journal's two-year RISC impact factor is 0.980.

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

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

На обложке: *Pseudomonas aeruginosa* (лицензированное изображение фотобанка ООО «Фотодженика» <https://photogenica.ru/zoom/PHX499575574/>)

Cover image: *Pseudomonas aeruginosa* (a licensed image from the Photogenica image bank <https://photogenica.ru/zoom/PHX499575574/>)

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)

Агафонов Александр Петрович, д-р биол. наук, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия)

Аракелов Сергей Александрович, канд. биол. наук, ФГУП «СПбНИИВС» ФМБА России (Санкт-Петербург, 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, ФGAOY BO Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Москва, Россия)

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

Гасич Елена Леонидовна, д-р биол. наук, доц., ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» (Минск, Республика Беларусь)

Гончаров Андрей Евгеньевич, канд. мед. наук, доц., ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» (Минск, Республика Беларусь)

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

Коровкин Алексей Сергеевич, канд. мед. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Лакота Ян, д-р мед. наук, Институт нормальной и патологической физиологии Центра экспериментальной медицины Словацкой академии наук (Братислава, Словакия)

Логунов Денис Юрьевич, д-р биол. наук, академик РАН, академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

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

Мовсисянц 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)

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф., АО «Генериум» (пос. 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

Мовсисянц Арташес Авакович,
д-р мед. наук, проф.

Научные редакторы

Гуасова 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

21.03.2024

Дата выхода в свет

28.03.2024

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,
2024

СОДЕРЖАНИЕ

Тема номера:

Стандартизация и контроль качества биологических
лекарственных препаратов

Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина, О.Б. Устинникова,
К.А. Саркисян, А.А. Мовсисянц, В.А. Меркулов, В.В. Косенко
**Требования к материалам раздела по стандартным
образцам, представляемым в досье на биологические
лекарственные средства**.....7

Л.А. Гайдерова, Ю.Н. Лебедева, Т.Н. Лобанова,
Э.К. Липатова, Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина
**Аттестация фармакопейного стандартного образца
для оценки специфической активности рекомбинантного
интерферона α -2b**..... 21

Е.В. Ноздрина, Д.А. Мазалев, Д.Р. Рогозина, С.П. Живодеров,
И.В. Лягоскин, Р.Р. Шукуров
**Разработка и валидация методики определения
остаточного белка А в фармацевтических субстанциях
терапевтических моноклональных антител** 32

М.А. Константинов, Д.Д. Жданов, И.Ю. Торопыгин
**Количественная масс-спектрометрия с меткой ^{18}O
как альтернативный подход к определению активности
протеаз на примере трипсина** 46

И.В. Касина, С.А. Алексеева, Т.И. Немировская
**Применение альтернативных методов оценки качества
вакцины туляреминой живой и вакцины бруцеллезной
живой по показателю «Подлинность»** 61

А.А. Савина, А.А. Воропаев, А.А. Алесина
**Анализ качества вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака
мочевыводящего пузыря с помощью контрольных карт Шухарта**..... 76

Рекомбинантные белки

А.П. Жеребцов, А.А. Калошин, Н.А. Михайлова
**Получение рекомбинантного флагеллина С
Pseudomonas aeruginosa и изучение его
иммунобиологических свойств** 91

Бактериофаги

Т.А. Кочетова, В.В. Юскевич, Ф.М. Зурабов, Г.Т. Садикова,
П.В. Медведев, В.М. Попова
**Выделение новых бактериофагов *Actinomyces oris*
и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и исследование их
биологических характеристик *in vitro***103

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)

Alexander P. Agafonov, Dr. Sci. (Biol.), State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector" (Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia)

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)

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

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

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

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

Elena L. Gasich, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (Minsk, Republic of Belarus)

Andrei Y. Hancharou, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Minsk, Republic of Belarus)

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)

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

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

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

Alexey S. Korovkin, Cand. Sci. (Med.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Ján Lakota, MD, PhD, Institute of Normal and Pathological Physiology at the Centre of Experimental Medicine of the Slovak Academy of Sciences (Bratislava, Slovakia)

Denis Yu. Logunov, Dr. Sci. (Biol.), Academician of the RAS, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya (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)

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

Artashes A. Movsesyants,

Dr. Sci. (Med.), Prof.

Science Editors

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

Elena A. Orlova-Yar

Translation Editor

Liubov A. Baltina

Postal address of the founder and editorial office

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051

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

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

biopreparaty@expmed.ru

Contract publisher

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

Printing office

Triada Publishing House LLC:
9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver
170034

Print run

150 copies. Free price

Passed for printing

21 March 2024

Date of publication

28 March 2024

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, 2024

CONTENTS

Issue topic

Standardisation and quality control of biologicals

R.A. Volkova, O.V. Fadeikina, O.B. Ustinnikova, K.A. Sarkisyan,
A.A. Movsesyants, V.A. Merkulov, V.V. Kosenko

**Requirements for the information on reference standards
submitted in the dossier for biologicals** 7

L.A. Gaiderova, Yu.N. Lebedeva, T.N. Lobanova,
E.K. Lipatova, R.A. Volkova, O.V. Fadeikina

**Certification of a pharmacopoeial reference standard
for potency testing of recombinant interferon α -2b** 21

E.V. Nozdrina, D.A. Mazalev, D.R. Rogozina,
S.P. Zhivoderov, I.V. Lyagoskin, R.R. Shukurov

**Development and validation of an analytical procedure
for the determination of residual protein A
in active substances of therapeutic monoclonal antibodies** 32

M.A. Konstantinov, D.D. Zhdanov, I.Yu. Toropygin
Quantitative mass spectrometry with ^{18}O labelling

**as an alternative approach for determining protease activity:
an example of trypsin** 46

I.V. Kasina, S.A. Alekseeva, T.I. Nemirovskaya

**Application of alternative identification methods
for live tularaemia and brucellosis vaccines** 61

A.A. Savina, A.A. Voropaev, A.A. Alesina

**Quality analysis of BCG vaccine for bladder cancer
immunotherapy using Shewhart control charts** 76

Recombinant proteins

A.P. Zherebtsov, A.A. Kaloshin, N.A. Mikhailova

**Production and immunological characterisation of recombinant
flagellin C of *Pseudomonas aeruginosa*** 91

Bacteriophages

T.A. Kochetova, V.V. Yuskevich, F.M. Zurabov,

G.T. Sadykova, P.V. Medvedev, V.M. Popova

**Isolation of novel *Actinomyces oris*
and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bacteriophages
and study of their biological characteristics *in vitro*** 103



Требования к материалам раздела по стандартным образцам, представляемым в досье на биологические лекарственные средства

Р.А. Волкова , О.В. Фадейкина, О.Б. Устинникова, К.А. Саркисян,
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

 Волкова Рауза Асхатовна; Volkova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ. Применение стандартного образца (СО), аттестованного в установленном порядке, является необходимым элементом стандартизации методики и обеспечивает возможность получения сопоставимых результатов при оценке показателей качества лекарственных средств в различных лабораториях, что важно при контроле качества биологических лекарственных средств (БЛС). При государственной регистрации лекарственного средства предусмотрено предоставление сведений о СО, однако конкретные требования к данному разделу досье отсутствуют, что обуславливает актуальность их разработки для дальнейшего включения в соответствующее руководство.

ЦЕЛЬ. Разработка требований к материалам раздела «Стандартные образцы» в досье на биологические лекарственные средства при их регистрации.

ОБСУЖДЕНИЕ. Проведен анализ международной (документы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Евразийского экономического союза) и российской нормативной правовой базы для СО БЛС, документов Международной организации по стандартизации (ISO) и Росстандарта, а также опыта аттестации и применения СО для контроля качества БЛС в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Рассмотрены особенности аттестации СО для БЛС с учетом различий методик измерений и методик испытания. Сформулированы основные требования к формированию материалов раздела по СО в досье на БЛС. Методики, используемые для аттестации СО (методики испытания), должны быть описаны в соответствии с требованиями к написанию стандартной операционной процедуры; необходимые валидационные характеристики методики должны быть установлены в адекватных валидационных исследованиях. Сформулированы требования к аттестации первичных СО для подтверждения структуры рекомбинантных белков новых БЛС. Установление значений аттестованных характеристик и критических показателей качества должно проводиться для СО, технология производства которого описана и соответствует рекомендациям ВОЗ или требованиям надлежащей производственной практики (GMP). Основные этапы аттестации являются общими для всех видов СО. Исследования стабильности СО для установления срока годности должны проводиться методом естественного старения. Ускоренные испытания стабильности могут быть полезны для изучения механизма деградации и влияния кратковременных отклонений от регламентированных условий хранения. В соответствии с рекомендациями ВОЗ должны быть установлены изменения в отношении СО, которые требуют одобрения регуляторным органом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Систематизированы требования к формированию материалов раздела по стандартным образцам в досье на биологические лекарственные средства для подготовки соответствующего руководства. Разработка этих требований обеспечит единый подход заявителей, разработчиков лекарственных средств и экспертов уполномоченного органа к подготовке, аттестации, оформлению документов на стандартные образцы и ускорит их рассмотрение при регистрации.

Ключевые слова: биологические лекарственные средства; стандартный образец; стандартный образец предприятия; СОп; биологические стандартные образцы; контроль качества; досье на биологическое лекарственное средство; аттестация стандартного образца; аттестованное значение; расширенная неопределенность; стабильность стандартного образца

Для цитирования: Волкова Р.А., Фадейкина О.В., Устинникова О.Б., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А., Меркулов В.А., Косенко В.В. Требования к материалам раздела по стандартным образцам, представляемым в досье на биологические лекарственные средства. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):7–20. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-7-20>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).

Конфликт интересов. В.А. Меркулов (с 2021 г.) является главным редактором, А.А. Мовсесянц (с 2001 г.) – членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Requirements for the information on reference standards submitted in the dossier for biologicals

Rauza A. Volkova ✉, Olga V. Fadeikina, Olga B. Ustinnikova, Karine A. Sarkisyan, 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

✉ Rauza A. Volkova; Volkova@expmed.ru

ABSTRACT

SCIENTIFIC RELEVANCE. The use of appropriately certified reference standards (RSs) is a necessary element of analytical procedure standardisation that ensures comparability of results across different laboratories assessing the quality of medicines, which is important for the quality control of biologicals. Marketing authorisation involves providing information on RSs, but no specific requirements are given for the relevant section of the dossier. Therefore, it is necessary to develop the requirements for the appropriate guidelines.

AIM. This study aimed to develop specific requirements for the materials that should be included in the Reference Standards section of the dossier for a biological product.

DISCUSSION. The authors analysed national and international regulatory frameworks governing RSs for biologicals, including documents by the World Health Organisation (WHO), the Eurasian Economic Union, the International Organisation for Standardisation (ISO), and the Russian Federal Agency for Technical Regulation and Metrology. Additionally, the authors analysed the experience of RS certification and use at the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. This article covers specific aspects of biological RS certification, considering the differences between measurement techniques and analytical procedures. The authors formulated the key requirements for the documents submitted in the dossier section on RSs for biologicals (biological reference materials). The methods (analytical procedures) used for RS certification should be described in accordance with the requirements for standard operating procedures. Adequate validation studies should establish the necessary validation characteristics of these analytical procedures. Additionally, this article presents the requirements developed to certify primary RSs for structure confirmation of proteins in novel biologicals. The values of certified characteristics and critical quality indicators should be established, and the RS production technology should be described and in compliance with WHO recommendations and/or Good Manufacturing Practice (GMP) standards. The basic certification stages are common to all types of RSs. The RS shelf life should be established in real-time stability studies, whereas accelerated stability testing may be useful for studying degradation mechanisms and

the effects of short-term deviations from the specified storage conditions. In accordance with WHO recommendations, the Reference Standards section of the registration dossier should specify changes to the RS that require regulatory approval.

CONCLUSIONS. The authors believe that the requirements for the materials in the Reference Standards section of the dossier for a biological product, as systematised in this study for inclusion in the relevant guidelines, will provide a unified approach to RS development, certification, and documentation for applicants, developers, and competent authority experts and will streamline RS consideration during marketing authorisation.

Keywords: biologicals; reference standard; in-house reference standard; biological reference materials; quality control; dossiers for biologicals; certification of reference standards; certified value; expanded uncertainty; stability of reference standards

For citation: Volkova R.A., Fadeikina O.V., Ustinnikova O.B., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A., Merkulov V.A., Kosenko V.V. Requirements for the information on reference standards submitted in the dossier for biologicals. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):7–20. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-7-20>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00026-24-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D reporting No. 124022200103-5).

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

Введение

В общих фармакопейных статьях (ОФС) «Стандартные образцы» согласно Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ)¹ и Фармакопее Евразийского экономического союза (ЕАЭС)² приведены общие требования к стандартным образцам (СО) и их классификация по разным признакам, в том числе по природе вещества. В соответствии с ОФС.2.3.11.0³ различают первичные и вторичные СО: «первичный стандартный образец – стандартный образец, обладающий необходимыми свойствами для предполагаемого использования, установленными без сравнения с существующими стандартными образцами», «вторичный стандартный образец – стандартный образец со значением свойства, установленным путем сравнения с первичным стандартным образцом».

При контроле качества биологических лекарственных средств (БЛС) стандартные образцы (далее – биологические СО) занимают ключевое место [1–4]. Рекомендации по разработке, изготовлению, утверждению, обращению биологических СО изложены в руководствах Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)⁴.

Применение СО, аттестованного в установленном порядке, является необходимым элементом стандартизации методики и обеспечивает возможность получения сопоставимых результатов при оценке качества лекарственных средств в различных лабораториях, что имеет важное значение при контроле качества БЛС [5–15].

Обязательное использование СО предусмотрено международными документами в области обращения лекарственных средств⁵, а также гармонизированными с ними

¹ ОФС.1.1.0007 Стандартные образцы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

² ОФС.2.3.11.0 Стандартные образцы. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. 1. Ч. 2. М.; 2023.

³ Там же.

⁴ Recommendations for the preparation, characterization, and establishment of international and other biological reference standards. Annex 2. TRS No. 932. WHO; 2006.

WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines. WHO/IVB/11/03. WHO; 2011.

⁵ Guidelines on stability evaluation of vaccines. Annex 3. TRS No. 962. WHO; 2011.

Guidelines on the quality, safety and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Annex 4. TRS No. 987. WHO; 2014.

Guidelines on procedures and data requirements for changes to approved vaccines. Annex 4. TRS No. 993. WHO; 2015.

WHO good manufacturing practices for biological products. Annex 2. TRS No. 999. WHO; 2016.

Guidelines on procedures and data requirements for changes to approved biotherapeutic products. Annex 3. TRS No. 1011. WHO; 2017.

ICH Q5C Guideline for industry. Quality of biotechnological products: Stability testing of biotechnological/biological products.

ICH Q5E Comparability of biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process; 2005.

ICH Q6B Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products.

документами ЕАЭС⁶ и ГФ РФ⁷. В указанных документах отражены общие положения в отношении СО для контроля БЛС.

Подходы к порядку оценки значения аттестуемой характеристики СО, в том числе в отношении использования статистических методов, изложены в документах Международной организации по стандартизации (International Organisation for Standardisation, ISO, ИСО) – ISO Guide 30, ISO Guide 31, ISO Guide 33, ISO Guide 34, ISO Guide 35. За последнее десятилетие документы ISO были доработаны: ISO Guide 30, ISO Guide 31, ISO Guide 33 обновлены в 2015 г.⁸, ISO Guide 35 существенно переработан в 2017 г.⁹ (добавлены аспекты аттестации СО в одной лаборатории с одной методикой и в нескольких лабораториях с разными методиками [16]), а ISO Guide 34 был переработан в международный стандарт ISO 17034:2016¹⁰ с учетом требований системы менеджмента качества, в который, помимо общих требований к компетентности производителей СО, включены требования к содержанию паспортов и этикеток, к оценке однородности, стабильности и оценке рисков [17]. Отечественная нормативно-методологическая база Государственной системы обеспечения единства измерений в настоящее время в основном гармонизирована с документами ISO по СО (за исключением ISO Guide 35:2017) прежде всего в отношении ряда терминов (в том числе понятий неопределенности и прослеживаемости): приняты межгосударственные стандарты¹¹ (ГОСТ ISO Guide 30-2019, ГОСТ ISO Guide 31-2019, ГОСТ ISO Guide 33-2019) и российские стандарты¹² (ГОСТ Р ИСО 17034-2021). В Российской Федерации также приняты стандарты, отражающие

специфику отечественной метрологической базы, но не имеющие международных аналогов¹³: ГОСТ 8.315-2019, ГОСТ Р 8.871-2014 и некоторые другие [18, 19].

Необходимо отметить отличие российской нормативной правовой базы от международной: в России действует Государственная система обеспечения единства измерений, которая предусматривает использование государственных стандартных образцов утвержденного типа (ГСО) для передачи единиц измерения в единицах системы СИ и, соответственно, наличие поверочных схем для соответствующего измерительного оборудования.

Однако следует отметить, что переносить систему передачи единиц измерения в единицах системы СИ, для которой имеются первичные эталоны, на другие области не всегда корректно. В частности, это касается области обращения лекарственных средств, в которой все этапы жизненного цикла лекарственных препаратов (от разработки до коммерческого выпуска, применения и утилизации) регламентированы собственными нормативными документами, в том числе международными. Для контроля качества лекарственных средств используются валидированные фармакопейные методики или методики предприятия, которые, как правило, нельзя отнести к методикам измерения. Это, по существу, методики испытания или даже «методы научного познания» [20]. Однако для отдельных видов лекарственных средств, например для имеющих химическое происхождение, рассматривается возможность применения не только фармакопейных СО, но и ГСО [20–23]. По мнению авторов данной статьи, при использовании ГСО, в области применения которых указаны здравоохранение и фармацевтика без необходимой

⁶ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78 «Об утверждении Правил регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

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

ОФС.2.3.11.0 Стандартные образцы. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. 1. Ч. 2. М.; 2023.

⁷ ОФС.1.1.0007 Стандартные образцы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

⁸ ISO Guide 30:2015. Reference materials – Selected terms and definitions.

ISO Guide 31:2015. Reference materials – Contents of certificates, labels and accompanying documentation.

ISO Guide 33:2015. Reference materials – Good practice in using reference materials.

⁹ ISO Guide 35:2017. Reference materials – Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability.

¹⁰ ISO 17034:2016 General requirements for the competence of reference material producers.

¹¹ ГОСТ ISO Guide 30-2019. Межгосударственный стандарт. Стандартные образцы. Некоторые термины и определения.

ГОСТ ISO Guide 31-2019. Содержание сертификатов, этикеток и сопроводительной документации.

ГОСТ ISO Guide 33-2019. Надлежащая практика применения стандартных образцов.

¹² ГОСТ Р ИСО 17034-2021. Общие требования к компетентности производителей стандартных образцов.

¹³ ГОСТ 8.315-2019. Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения.

ГОСТ Р 8.871-2014. Стандартные образцы предприятий и отраслей. Общие требования.

детализации и указания конкретных методик, может существовать ошибочное понимание в отношении возможности их использования без соответствующего обоснования.

При государственной регистрации лекарственного средства предусмотрено предоставление сведений о СО. Общие положения о СО изложены в международных и российских нормативных документах, но отсутствие конкретных требований к данному разделу досье БЛС обуславливает актуальность работы по их формулированию с учетом имеющейся нормативной правовой базы.

Цель работы – разработка требований к материалам раздела «Стандартные образцы» в досье на БЛС при их регистрации.

Особенности аттестации стандартных образцов для контроля качества биологических лекарственных средств

Процедура аттестации СО для контроля качества БЛС характеризуется следующими особенностями: для аттестации СО, как правило, применяют ту же методику, для которой предусмотрено применение данного СО, что определяет зависимость значения аттестуемой характеристики СО и его неопределенности от использующейся методики испытаний, которую не следует называть методикой измерения [4].

Термин «методика измерения» не может быть распространен на все методики, в том числе методики испытаний, каковыми являются большинство фармакопейных методик, использующихся для контроля качества БЛС [1, 3, 4]. В случае методик измерения СО являются средством передачи единицы измерения, выраженной в единицах системы СИ, при этом возможна оценка как систематической, так и случайной составляющих погрешности измерения. Для методик испытаний следует говорить не о погрешности, а о неопределенности методики. В этом случае средством передачи единицы измерения становится комплекс методики с используемым СО, а сам термин «единица измерения» оказывается условным, так как, в сущности, передается единица некой величины – например содержание какого-либо компонента, установленное определенным

методом, или специфическая активность в принятых условных единицах, различающихся для разных методик и объектов испытания. Для методик испытаний раздельное определение систематической и случайной составляющих погрешности невозможно, также невозможно оценить вклад от неоднородности и нестабильности материала СО, а следовательно, невозможно и использование предусмотренного алгоритма расчета погрешности без вынужденных допущений [4]. Поэтому принципиально важным является не только подробное описание всех этапов методики испытания (приготовление растворов реактивов, подготовка пробы, проведение испытаний, оценка результатов и необходимых расчетов, представление результатов) в соответствии с требованиями к написанию стандартной операционной процедуры, но и проведение адекватных валидационных исследований для оценки правильности и прецизионности методики согласно документам ЕАЭС¹⁴, в том числе с учетом обновленного документа ICH Q2(R2)¹⁵ и нового документа ICH Q14¹⁶, посвященного разработке аналитических процедур.

Специфическая активность является одним из важнейших показателей качества БЛС и одной из основных характеристик СО для контроля качества БЛС, при определении которой часто используют методики с применением живых бактерий, вирусов, клеточных культур или животных. Большое количество влияющих факторов обуславливает вариабельность результатов аналитической методики, применяющейся для оценки качества БЛС, в силу чего неопределенность таких методик может быть более 20%. Поэтому для принятия корректных решений как при оценке результатов контроля качества, так и при аттестации и применении СО, а также при анализе рисков важна объективная оценка валидационных характеристик методик испытаний и, соответственно, их неопределенности, особенно методик определения показателей, связанных с эффективностью и безопасностью БЛС [1, 4, 24].

Работы по производству, аттестации, обращению и применению СО должны проводиться в соответствии с требованиями системы управления качеством¹⁷.

¹⁴ ОФС.2.3.14.0. Валидация аналитических методик. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. 1. Ч. 2. М.; 2023. Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. ЕАЭС; 2018.

¹⁵ ICH Q2 (R2) Validation of analytical procedures; 2023.

¹⁶ ICH Q14 Guideline on analytical procedures development; 2023.

¹⁷ ГОСТ Р ИСО 17034–2021. Общие требования к компетентности производителей стандартных образцов. ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Межгосударственный стандарт. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

Аттестация стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков

Отличительной особенностью биотехнологических лекарственных средств, представляющих собой рекомбинантные белки, является необходимость подтверждения их подлинности не только на уровне специфической биологической активности, но и на уровне структуры молекулы действующего вещества. Методики оценки подлинности БЛС требуют сравнения с СО и являются качественными по своей сути. Тем не менее для подтверждения подлинности структуры рекомбинантного белка каждой серии продукта требуется применение метода пептидного картирования с УФ-ВЭЖХ детектированием продуктов ферментативного гидролиза белка, а для гликозилированных продуктов – метода картирования гликанов (определения профиля гликанов) с флуоресцентным ВЭЖХ детектированием ферментативно отщепленных, меченых гликанов¹⁸ с установлением соотношения определяемых компонентов в сравнении с СО.

Для новых БЛС, как правило, отсутствуют международные или фармакопейные СО, в связи с чем актуальна разработка первичных СО, учитывающая посттрансляционные модификации белковой молекулы или профиль направленной модификации белка, например конъюгирования, которые индивидуальны для каждого продукта. При этом важна максимально полная характеристика СО для обеспечения объективности оценки подлинности и чистоты терапевтического белка [12].

Для испытаний используются различные высокотехнологичные физико-химические методы исследования: ядерный магнитный резонанс, анализ пептидных фрагментов после гидролиза с помощью ВЭЖХ, в том числе с масс-спектрометрическим детектированием, и другие¹⁹.

Процедура разработки первичных СО для оценки подлинности структуры молекулы рекомбинантного терапевтического белка должна включать:

- обоснование выбора материала, формы выпуска (объем розлива, концентрация белка, значение pH, наличие или отсутствие стабилизатора) и физического состояния – замороженный раствор/лиофилизат;
- обоснование набора показателей качества в спецификации, которая должна включать

в себя не только показатели качества на активную фармацевтическую субстанцию, но и характеристику структуры действующего вещества, установленную при разработке БЛС [12].

Необходимо отметить, что на фоне расширения производства рекомбинантных белков и моноклональных антител в последнее десятилетие в Российской Федерации быстрыми темпами разрабатывается новая группа иммунобиологических препаратов – вакцин на основе модифицированных вирусных векторов. Определение подлинности препаратов данной группы помимо оценки специфической активности требует подтверждения подлинности в сравнении с СО, которым является модифицированный вирус и для которого должна быть установлена нуклеотидная последовательность. Ранее прямое подтверждение нуклеотидной последовательности требовалось для экспрессирующей конструкции, вектора и продуцента рекомбинантного белка при разработке препарата и создании банков вектора и штамма-продуцента. Оценку нуклеотидной последовательности можно отнести к качественному показателю. В работе В.В. Морозовой и соавт. [20] освещена проблема обеспечения метрологической прослеживаемости результатов исследований качественных свойств биологических субстанций, поскольку соответствующие эталоны и ГСО отсутствуют, а специалисты Государственной службы стандартных образцов считают необходимым обеспечить ими любые испытания. В статье упомянуты восемь ГСО биологических субстанций, для двух из них (СО фрагмента митохондриальной ДНК человека и инактивированного штамма «ГК2020/1» коронавируса SARS-CoV-2) авторы предложили методы установления показателя «последовательность нуклеотидов нуклеиновых кислот» в качестве дополнительных аттестованных характеристик. При этом, подчеркивая различия между процессом измерений и процессом исследований качественных свойств, авторы считают перспективным продолжение исследований в направлении разработки концепции оценки прослеживаемости для СО качественных свойств [20], несмотря на то что международное сообщество склоняется для данного вида методов к оценке вероятности правильного определения нуклеотидной последовательности.

На основе материалов, описанных авторами в данной работе и в более ранних публикациях [1, 3, 4, 24], показано, что между методами

¹⁸ 1055 Biotechnology-derived articles – peptide mapping. United States Pharmacopeia. USP–NF 2023. Rockville, MD; 2023. 01/2011(11.0):20259. Glycan analysis of glycoproteins. European Pharmacopoeia. 11 ed. Strasbourg; 2023.

¹⁹ Guidance on the description of composition of pegylated (conjugated) proteins in the SPC (EMA/CMP/BWP/3068/03). EMA; 2003.

измерения и любыми методами испытания (методами для контроля качества БЛС) существуют различия. По нашему мнению, актуальной является задача разработки теории, требований и практики применения в российской метрологии инструментов оценки правильности и прецизионности методик испытаний при проведении валидационных исследований, а не обеспечения прослеживаемости результатов исследований качественных свойств.

Установление значений аттестуемых характеристик и критических показателей качества

Установление значений аттестуемых характеристик и критических показателей качества должно проводиться для СО, технология производства которого описана и соответствует рекомендациям ВОЗ или требованиям надлежащей производственной практики (Good Manufacturing Practices, GMP). В руководстве ВОЗ²⁰ даны общие требования к оборудованию, средствам измерений, используемым при производстве СО, однородности материала СО, качеству стекла ампул и флаконов, требованиям к консервантам и наполнителям, а также к параметрам процесса лиофилизации и запайки ампул. Технологический процесс получения СО при необходимости может отличаться от технологического процесса получения БЛС наличием дополнительных стадий очистки или требований при отборе материала. Операции по производству стандартного (референтного) материала необходимо выполнять в соответствии с требованиями GMP и системой качества, принятой на производстве.

Основными этапами аттестации всех видов СО для контроля БЛС согласно международным документам и документам ЕАЭС являются:

- выбор материала СО, формы выпуска, методов оценки качества и аттестации;
- установление значения аттестуемой характеристики и границ его неопределенности (если применимо);
- исследование стабильности и установление срока годности, определение оптимальных условий хранения и транспортирования;
- разработка и утверждение документации

на СО (паспорт, инструкция по применению, макет упаковки) в соответствии с системой качества, принятой на предприятии.

Биологическая активность БЛС, как правило, выражается или в условных единицах – МЕ/мл при наличии международных СО, или (при их отсутствии) в других обоснованных единицах (БОЕ/мл, КОЕ/мл, LD₅₀, ТЦД₅₀ и др.), связанных с механизмом действия биологического препарата [5, 10].

Для характеристики и аттестации любого СО необходимо использовать валидированные методики²¹. Эти же методики, как правило, применяются для оценки соответствующих показателей качества БЛС. Материалы по изучению или подтверждению валидационных характеристик методик должны включать все первичные данные и быть оформлены в соответствии с системой качества, принятой на предприятии, а также должны быть доступны для экспертизы при регистрации.

Аттестацию проводят с использованием соответствующих международных или фармакопейных СО при их наличии. При их отсутствии, что характерно для новых лекарственных средств, международными требованиями предусмотрена возможность применения разработанного заявителем собственного первичного референтного/стандартного образца/материала [6]. Для полного доказательства воспроизведения структуры целевого белка в спецификации первичного СО должна быть предусмотрена оценка высокотехнологичным методом дополнительной критичной характеристики, установленной при разработке препарата.

Неопределенностью аттестованного значения СО (в документах Росстандарта используется термин «погрешность») называют параметр, который связан с результатом измерения аттестованного значения СО и характеризует диапазон, в котором может находиться значение аттестованной характеристики СО. В соответствии с ISO Guide 35:2017 неопределенность (u_c) следует рассчитывать как сумму всех составляющих неопределенности²² – неопределенности от неоднородности (u_h), неопределенности от нестабильности материала (u_{stab}), неопределенности от способа установления значения

²⁰ Recommendations for the preparation, characterization, and establishment of international and other biological reference standards. Annex 2. TRS No. 932. WHO; 2006.

²¹ ОФС.2.3.14.0. Валидация аналитических методик. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. 1. Ч. 2. М.; 2023. ICH Q2 (R2) Validation of analytical procedures; 2023.

ICH Q14 Guideline on analytical procedures development; 2023.

Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. 3 изд. QUAM:2012.P1-RU.

²² ISO Guide 35:2017. Reference materials – Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability.

аттестуемой характеристики (u_{char}) согласно формуле (1):

$$u_c = \sqrt{u_{\text{char}}^2 + u_h^2 + u_{\text{stab}}^2}. \quad (1)$$

Параметр u_{char} оценивают как сумму систематической и случайной ошибок измерения. При этом составляющие неопределенности невозможно оценить для методов испытаний без использования допущений [4].

При нормальном распределении результатов неопределенность выражают в форме стандартного отклонения, которое называют стандартной неопределенностью (u_c), и расширенной неопределенности (U_p) – стандартной неопределенности, умноженной на коэффициент охвата 2, то есть $2u_c$, при уровне доверия ~95%²³.

Для получения надежных оценок неопределенности СО необходимо использовать результаты аттестации, полученные не только разными операторами, но и с учетом в максимально возможной степени всех допустимых в методике вариантов проведения испытаний, например применяемого оборудования и реагентов [4, 24]. Оценка неопределенности должна быть основана на максимально возможном массиве данных. Для биологического СО неопределенность оценивают по стандартному отклонению методики, которая используется для установления его аттестованного значения. При отсутствии сведений о неопределенности методики неопределенность значения аттестованной характеристики биологических СО (U_p) оценивают по стандартному отклонению (S_{co}) результатов испытаний в условиях воспроизводимости или промежуточной прецизионности по формуле (2):

$$U_p = 2\sqrt{S_{\text{co}}^2} = 2S_{\text{co}}, \quad (2)$$

где S_{co} – стандартное отклонение результатов измерений/испытаний в условиях воспроизводимости или промежуточной прецизионности [4].

Примеры аттестации биологических СО и расчета неопределенности представлены в научной литературе [5, 7, 8, 10].

При применении СО рекомендуется учитывать требования руководства ВОЗ²⁴ по Надлежащей практике для национальных фармацевтических контрольных лабораторий: обязательно наличие

записей по работе с СО (идентификация СО, наименование производителя, номер партии/серии, дата утверждения, аттестованные значения, сроки годности, место хранения и другая необходимая информация, например результаты исследования стабильности). Информация об используемых СО должна содержаться в базе данных учреждения (предприятия).

Исследование стабильности стандартных образцов

Исследования стабильности для установления срока годности, условий хранения, транспортирования и применения биологических СО проводят в соответствии с документами ЕАЭС²⁵ и ГФ РФ²⁶. С этой целью разрабатывают программу исследования стабильности, в которой предусматривают продолжительность, периодичность (интервалы), температурные режимы хранения, количество образцов, вид испытаний, количество операторов.

Срок годности устанавливают по результатам изучения стабильности методом естественного старения (в реальном времени). Ускоренные испытания стабильности – это исследования, направленные на увеличение скорости химической деградации/деструкции или физического изменения БЛС путем использования неблагоприятных условий хранения, которые могут быть применены для оценки влияния кратковременных отступлений от заявленных условий хранения. Следует различать ускоренные испытания стабильности и метод ускоренного старения. При исследовании стабильности методом ускоренного старения возможна оценка предполагаемого срока годности, результаты которого следует подтверждать данными изучения стабильности в реальном времени [10].

Продолжительность времени исследования стабильности должна быть не менее предполагаемого срока годности СО.

В Программе исследования стабильности также должно быть предусмотрено изучение восстановленного/разведенного СО, если предполагается возможность непродолжительного хранения после вскрытия емкости. Исследование планируют таким образом, чтобы оно моделировало

²³ Там же.

²⁴ Good practices for national pharmaceutical control laboratories. Annex 3. TRS No. 902. WHO; 2002.

²⁵ Глава 8. Исследование стабильности биотехнологических (биологических) препаратов при внесении изменений в производственный процесс: доклинические и клинические исследования. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

²⁶ ОФС.1.1.0020.18 Стабильность биологических лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

реальные условия применения, в том числе возможность замораживания и оттаивания СО.

Анализ в стрессовых условиях (например, при повышенной температуре) полезен для оценки влияния кратковременного отклонения от регламентированных условий хранения (например, во время транспортировки). С этой целью может быть применена следующая схема изучения стабильности в стрессовых условиях. До проведения исследования проводят контроль значения аттестованной характеристики и по всем показателям спецификации (например, описание, внешний вид, подлинность, для лиофилизатов – растворимость, потеря в массе при высушивании, вода (по Фишеру), средняя масса, отклонение от средней массы и др.).

В начале срока годности СО выдерживают при повышенной температуре (например, 25 ± 2 и 37 ± 2 °C) в течение 10 и 30 сут, затем исследуют в два этапа. Первую часть ампул анализируют непосредственно по истечении каждого периода температурного воздействия. Вторую часть образцов, подвергшихся воздействию повышенной температуры, продолжают хранить в регламентированных условиях до истечения срока годности. На исходе срока годности проводят контроль СО, подвергшихся температурному воздействию, в сравнении с контрольными экземплярами. Контрольными образцами в испытаниях служат образцы, хранящиеся в течение всего срока годности в регламентированных условиях (например, при температуре от 2 до 8 °C).

Контролируемый показатель – значение аттестованной характеристики. Дополнительные показатели: описание; внешний вид; для лиофилизатов – растворимость, потеря в массе при высушивании и/или вода (по Фишеру).

Показатели температуры и влажности помещений и, при необходимости, другие параметры должны быть зарегистрированы.

Результаты исследования стабильности оформляют в соответствии с системой качества, принятой на предприятии. По результатам исследования должны быть сформулированы требования к материалам первичной и вторичной упаковки, герметичности, защите от воздействия света, наличию остаточного количества воздуха и его компонентов в первичной упаковке после укупорки или запаивания, а также необходимые ограничения по температурному режиму хранения.

При использовании в качестве кандидата в СО одной из серий готового препарата требования к материалу первичной и вторичной упаковки, гер-

метичности, защите от воздействия света, необходимые ограничения по температурному режиму хранения, а также срок годности аттестуемого СО могут соответствовать требованиям нормативной документации на соответствующее БЛС.

Внесение изменений в регистрационное досье в отношении использования стандартных образцов

В соответствии с руководствами ВОЗ определены категории при внесении изменений в отношении СО²⁷: например, при замене первичного СО, замене СО с фармакопейного или международного на внутренний (не связанный с международным стандартом), изменении программы аттестации СО и его характеристики требуется рассмотрение и одобрение уполномоченным органом.

При внесении изменений в отношении используемых СО целесообразно составление Протокола сопоставимости (другое название – Протокол управления пострегистрационными изменениями), в котором устанавливают план будущей реализации изменений. Документ включает необходимые испытания и допустимые пределы, обоснованные материалами по валидации методики. Допустимые пределы нужны для оценки влияния конкретных изменений на качество, безопасность или эффективность БЛС и демонстрации сопоставимости препаратов до и после внесения изменений.

Для некоторых изменений стандартные испытания качества, проводимые при выпуске фармацевтических субстанций или лекарственных препаратов, могут оказаться недостаточными для оценки влияния изменения, поэтому могут потребоваться дополнительные испытания в процессе производства и оценки характеристик. Протоколы сопоставимости часто применяются для планового пополнения Рабочего банка клеток и запасов СО, используемых в испытаниях контроля качества (при истечении срока годности или снижении количества аликвот). Цель протокола сопоставимости – обеспечение прозрачности требований к сопроводительным данным для вносимых изменений и повышение предсказуемости последствий изменений.

Формирование материалов раздела «Стандартные образцы» в досье на биологические лекарственные средства

В досье для регистрации БЛС в отношении используемых СО представляют материалы

²⁷ Guidelines on procedures and data requirements for changes to approved vaccines. Annex 4. TRS No. 993. WHO; 2014.
Guidelines on procedures and data requirements for changes to approved biotechnological products. Annex 3. TRS No. 1011. WHO; 2017.

в соответствии с Правилами регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения ЕАЭС²⁸ (требования к модулям 1–3). Для международных и фармакопейных СО зарубежных фармакопей, фармакопеи ЕАЭС и ГФ РФ должны быть представлены паспорта/сертификаты. Методики, в которых они применяются, должны быть валидированы с применением соответствующих СО. Отчетные материалы по их аттестации должны храниться у уполномоченных органов. Материалы по аттестации отечественных фармакопейных СО для контроля качества БЛС должны соответствовать рассмотренным в статье требованиям.

На предприятии, производящем БЛС, при использовании собственного стандартного образца предприятия (СОп) должны находиться материалы, которые могут быть запрошены в процессе экспертизы, а именно:

- паспорт/сертификат, который представляется при регистрации и должен содержать необходимые сведения: название документа; название и адрес организации, проводившей аттестацию; идентификационный номер; назначение; наименование аттестованной характеристики (аттестованное значение и его неопределенность); описание; прослеживаемость к СО, использованному при аттестации актуального стандартного образца (если применимо); порядок применения; условия транспортирования и хранения; требования безопасности; дата выпуска; срок годности; фамилия и подпись уполномоченного лица;
- схема производства СО, включая контрольные точки. Если производство отличается от технологии получения ЛС, например при необходимости проведения дополнительной очистки стандартных материалов, это должно быть указано в схеме производства;
- документы по порядку проведения и оформлению результатов аттестации, включая все первичные данные: материалы по установлению значения аттестованной характеристики и показателей качества СО; указание и описание аналитических методик, материалы по валидации данных методик; результаты изучения стабильности СО, обосновывающие срок его годности; порядок оформления результатов аттестации и документов на СО, в том числе правило при-

своения идентификационного номера СО, порядок их утверждения; порядок внесения изменений в отношении СО; прослеживаемость серии СО к серии, использовавшейся при проведении доклинических и/или клинических исследований.

Результаты проверки наличия необходимых материалов для СОп целесообразно оформить в виде отдельного документа, например чек-листа, в соответствии со стандартной операционной процедурой (СОП) системы качества производителя БЛС, заявителя или регуляторного органа. Пример оформления чек-листа представлен в *таблице 1*.

При оформлении чек-листа в связи с внесением изменений должны быть учтены соответствующие требования протокола сопоставимости результатов.

Таким образом, в досье для регистрации БЛС должны быть представлены паспорта (сертификаты) используемых СО. Методики, в которых они применяются, должны быть валидированы с применением соответствующих СО.

При использовании СОп в досье должны быть представлены не только паспорта (сертификаты) на СОп, но и схема производства СОп, если она отличается от схемы производства БЛС. На предприятии, производящем БЛС, должны находиться материалы, которые могут быть запрошены в процессе экспертизы, а именно документы по порядку проведения и оформления результатов аттестации СОп, включая все первичные данные.

Заключение

Проведенный анализ и систематизация международной и российской нормативной правовой документации для стандартных образцов, а также опыт аттестации и применения биологических стандартных образцов в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России позволили разработать требования к формированию раздела по стандартным образцам в досье на биологические лекарственные средства для дальнейшего включения в соответствующее руководство.

Разработка требований к материалам раздела «Стандартные образцы» обеспечит единый подход заявителей, разработчиков и экспертов уполномоченного органа к подготовке, аттестации, оформлению документов на стандартные образцы.

²⁸ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78 «Об утверждении Правил регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

Таблица 1. Пример оформления чек-листа по формированию материалов раздела «Стандартные образцы» для досье на биологическое лекарственное средство

Table 1. Model checklist for preparing materials for the Reference Standards section of the dossier for a biological product

Форма XXX-СОП УУУУУУ Form XXX-SOP YYYYYY	
Подготовленные материалы в раздел «Стандартные образцы» досье на биологическое лекарственное средство _____ предприятия _____ Дата _____ <i>Materials for the Reference Standards section of the dossier for the biological product _____ by the manufacturer _____</i> Дата _____	
Материалы в раздел для каждого СОП <i>Materials for each in-house RS in the section</i>	Наличие/отсутствие <i>Present/absent</i>
1. Производство <i>Production</i>	
1.1 Технологическая схема с контрольными точками / регламент производства СОП <i>Process diagram with control points / Master formula for the in-house RS</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
1.2 Порядок присвоения номера серии СОП <i>Procedure for assigning the in-house RS with the batch/lot number</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
1.3 Сводный протокол производства серии СОП <i>Batch production record for the in-house RS</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
2. Установление значения аттестуемой характеристики и критических показателей качества СОП <i>Establishing the values of the certified characteristic and the critical quality indicators for the in-house RS</i>	
2.1 Программа аттестации СОП <i>Certification programme for the in-house RS</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
2.2 Спецификация на СОП <i>Specification for the in-house RS</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
2.3 Стандартные операционные процедуры <i>Standard operating procedures</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
2.4 Отчет о валидации методик, используемых при аттестации СОП, включая первичные данные <i>Report on validation of analytical procedures for in-house RS certification, including primary data</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
2.5 Отчет об аттестации СОП, включая первичные данные <i>Report on in-house RS certification, including primary data</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
2.5.1 Показатели качества спецификации СОП <i>Quality indicators of the in-house RS specification</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
2.5.2 Установление значения аттестованной характеристики СОП и статистическая обработка результатов <i>Determination of certified characteristic values for the in-house RS and statistical processing of results</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
2.5.3 Исследование однородности СОП <i>Homogeneity study of the in-house RS</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
3. Исследование стабильности СОП <i>Stability study of the in-house RS</i>	
3.1 Программа исследования стабильности СОП <i>Stability programme for the in-house RS</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
3.2 Отчет об исследовании стабильности, включая первичные данные <i>Report on stability studies of the in-house RS, including primary data</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
4. Документы на СОП <i>Documentation for the in-house RS</i>	
4.1 Паспорт/сертификат СОП <i>Certificate for the in-house RS</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
4.2 Инструкция по применению/СОП на методику <i>Instructions/SOPs for analytical procedures</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
4.3 Макет этикетки СОП <i>Labelling mock-up for the in-house RS</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
Выводы: <i>Conclusions:</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
Материалы подготовлены в полном объеме <i>The materials have been prepared in full</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
Дополнить материалы в отношении пункта(ов) <i>Materials should be added to the item(s)</i>	Да ☐ / Нет ☐ <i>Yes ☐ / No ☐</i>
Проверил: _____ ФИО/подпись (подпись лица, проверившего наличие документов) <i>Checked by: _____ Full name/signature</i> (signature of the person who verified the presence of the documents)	

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. СОП — стандартная операционная процедура; СОП — стандартный образец предприятия.
Note. SOP, standard operating procedure; RS, reference standard.

Литература/References

1. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Устинникова ОБ, Саканян ЕИ, Меркулов ВА, Мовсесянц АА и др. Современные проблемы стандартных образцов лекарственных средств в Российской Федерации. *Фармация*. 2020;69(2):5–11.
Volkova RA, Fadeikina OV, Ustinnikova OB, Sakanyan EI, Merkulov VA, Movsesyants AA, et al. Current problems with the standard samples of medicines in the Russian Federation. *Pharmacy*. 2020;69(2):5–11 (In Russ.).
<https://doi.org/10.29296/25419218-2020-02-01>
2. Гегечкори ВИ, Шатилина АА, Шульга НА, Петухова ЯД, Смирнов ВВ, Раменская ГВ. Биологические стандартные образцы: актуальные вопросы разработки и порядка аттестации. *Эталоны. Стандартные образцы*. 2023;19(3):21–9.
Gegechkori VI, Shatilina AA, Shulga NA, Petukhova YaD, Smirnov VV, Ramenskaya GV. Biological reference materials: topical issues of development and certification procedure. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(3):21–9 (In Russ.).
<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-21-29>
3. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50>
Fadeikina OV, Volkova RA. Elaboration of certification procedures for reference standards of biological drugs. *Pharm Chem J*. 2017;51(8):716–21.
<https://doi.org/10.1007/s11094-017-1680-6>
4. 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](#)
5. Карпова ЕВ, Сангаджиева АД, Мамонтова ТВ, Фадейкина ОВ, Волкова РА, Саркисян КА, Мовсесянц АА. Аттестация отраслевого стандартного образца специфической активности вакцины полиомиелитной пероральной, двухвалентной, живой аттенуированной 1, 3 типов — Бивак полио. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(2):122–7.
Karpova EV, Sangadzhieva AD, Mamontova TV, Fadeikina OV, Volkova RA, Sarkisyan KA, Movsesyants AA. Certification of the industry reference standard for the specific activity of “Bivac polio” — live attenuated bivalent oral polio vaccine type 1 and 3. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(2):122–7 (In Russ.). EDN: [ZGVOZD](#)
6. Устинникова ОБ, Голощاپова ЕО, Рунова ОБ, Коротков МГ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартного образца метиониновой формы интерферона альфа-2b для подтверждения подлинности методом пептидного картирования. *Медицинская иммунология*. 2018;20(4):543–50.
Ustinnikova OB, Goloshchapova EO, Runova OB, Kоротkov MG, Volkova RA. Development of a qualification procedure for methionine form of interferon alpha-2b standard to confirm its authenticity by means of a peptide mapping method. *Medical Immunology (Russia)*. 2018;20(4):543–50 (In Russ.).
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-4-543-550>
7. Шведова ЕВ, Клепикова АГ, Фадейкина ОВ, Шведов ДВ, Борисевич ИВ, Солдатов АА. Разработка фармакопейного стандартного образца для количественного определения активности иммуноглобулина человека антирезус Rho(D). *Иммунология*. 2023;44(3):358–67.
Shvedova EV, Klepikova AG, Fadeikina OV, Shvedov DV, Borisevich IV, Soldatov AA. Development of a pharmacopoeia standard for the quantitative determination of the activity of human immunoglobulin antirhesus RHo(D). *Immunology*. 2023;44(3):358–67 (In Russ.).
<https://doi.org/10.33029/1816-2134-2023-44-3-358-367>
8. Нечаев АВ, Кудашева ЭЮ, Постнова ЕЛ, Волкова РА, Фадейкина ОВ, Борисевич ИВ, Мовсесянц АА. 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):443–51.
Nechaev AV, Kudasheva EYu, Postnova EL, Fadeikina OV, Borisevich IV, Movsesyants AA. 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):443–51 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-443-451>
9. Бинятова АС, Юнасова ТН, Ильясова ТН, Саркисян КА, Фадейкина ОВ, Мовсесянц АА. Анализ качества комбинированной отечественной вакцины для профилактики кори, краснухи и паротита. *Вопросы вирусологии*. 2022;67(5):414–22.
Binyatova AS, Yunasova TN, Ilyasova TN, Sarkisyan KA, Fadeikina OV, Movsesyants AA. Quality analysis of a combined domestic vaccine for the prevention of measles, rubella and mumps. *Problems of Virology*. 2022;67(5):414–22 (In Russ.).
<https://doi.org/10.36233/0507-4088-131>
10. Юнасова ТН, Фадейкина ОВ, Сидоренко ЕС, Суханова ЛЛ, Шитикова ОЮ, Саркисян КА и др. Разработка и изучение отраслевого стандартного образца активности вакцины против краснухи. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;(3):49–53.
Yunasova TN, Fadeikina OV, Sidorenko ES, Sukhanova LL, Shitikova OYu, Sarkisyan KA, et al. Development and investigation of branch standard sample for rubella vaccine. *Biopreparation (Biopharmaceuti-*

- cal). 2015;(3):49–53 (In Russ.).
EDN: [UJWZ](https://doi.org/10.1007/s00769-017-1285-5)
11. Бинятова АС, Юнасова ТН, Волкова РА, Бутырский АЮ, Ильясова ТН, Саркисян КА, Мовсесянц АА. Опыт применения фармакопейного стандартного образца активности коревой вакцины. *Вопросы вирусологии*. 2023;68(4):327–33.
Binyatova AS, Yunasova TN, Volkova RA, Butirskiy AYU, Ilyasova TN, Sarkisyan KA, Movsesyants AA. Experience with the use of pharmacopoeial reference material for the activity of measles vaccine. *Problems of Virology*. 2023;68(4):327–33 (In Russ.).
<https://doi.org/10.36233/0507-4088-185>
 12. Устинникова ОБ, Волкова РА, Мовсесянц АА, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Рекомендации по аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):218–25.
Ustinnikova OB, Volkova RA, Movsesyants AA, Merkulov VA, Bondarev VP. Recommendations on the certification of reference standards for structure identification of recombinant therapeutic proteins. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):218–25 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-218-225>
 13. Бинятова АС, Юнасова ТН, Саркисян КА, Давыдов ДС, Ильясова ТН, Мовсесянц АА. Мониторинг качества отечественных вакцин для профилактики кори. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2021;20(2):58–67.
Binyatova AS, Yunasova TN, Sarkisyan KA, Davydov DS, Ilyasova TN, Movsesyants AA. Monitoring the quality of domestic measles prevention vaccines. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021;20(2):58–67 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-2-58-67>
 14. Калинина ЕН, Вильданова НС, Кормщикова ЕС, Йовдий АВ, Смольникова МВ. Определение критериев качества кандидата в стандартный образец содержания антител антирезус Rh₀(d). *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(6):90–100.
Kalinina EN, Vildanova NS, Kormshchikova ES, Yovdiy AV, Smolnikova MV. Determination of quality criteria for candidate standard for anti-D immunoglobulin. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(6):90–100 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18699/SSMJ20230611>
 15. Кормщикова ЕС, Росина ЕВ, Воробьев КА, Парамонов ИВ, Кудашева Э.Ю. Получение стабильной формы стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита. *Биотехнология*. 2021;37(3):42–52.
Kormshchikova ES, Rosina EV, Vorobiev KA, Paramonov IV, Kudashева EYu. Obtaining of the stable formulation of reference sample for human IgG antibodies to tick-borne encephalitis. *Biotechnology*. 2021;37(3):42–52 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-3-42-52>
 16. Trapmann S, Botha A, Linsinger TPJ, MacCurtain S, Emons H. The new International Standard ISO 17034: general requirements for the competence of reference material producers. *Accred Qual Assur*. 2017;22:381–7.
<https://doi.org/10.1007/s00769-017-1285-5>
 17. Linsinger TPJ, Botha A. Principles for the characterisation and the value assignment of the candidate reference material in the new ISO Guide 35:2017. *Accred Qual Assur*. 2019;24:157–61.
<https://doi.org/10.1007/s00769-018-1364-2>
 18. Мигаль ПВ, Собина ЕП, Аронов ПМ, Кремлева ОН, Студенок ВВ, Фирсанов ВА, Медведевских СВ. Об оценке стабильности стандартных образцов. *Эталоны. Стандартные образцы*. 2023;19(3):65–75.
Migal PV, Sobina EP, Aronov PM, Kremleva ON, Studenok VV, Firsanov VA, Medvedevskikh SV. On the stability testing of reference materials. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(3):65–75 (In Russ.).
<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-65-75>
 19. Собина ЕП, Аронов ПМ, Мигаль ПВ, Кремлева ОН, Студенок ВВ, Фирсанов ВА, Медведевских СВ. Алгоритмы оценивания однородности стандартных образцов состава и свойств дисперсных и монокристаллических материалов. *Эталоны. Стандартные образцы*. 2023;19(3):77–91.
Sobina EP, Aronov PM, Migal PV, Kremleva ON, Studenok VV, Firsanov VA, Medvedevskikh SV. Algorithms for homogeneity testing of reference materials of dispersed and solid materials. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(3):77–91 (In Russ.).
<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-77-91>
 20. Морозова ВВ, Кулябина ЕВ, Морозов ВЮ, Кулябина ТВ. Стандартные образцы качественных свойств биологических субстанций. *Эталоны. Стандартные образцы*. 2023;19(3):45–54.
Morozova VV, Kulyabina EV, Morozov VYu, Kulyabina TV. Reference materials for nominal properties of biological substances. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(3):45–54 (In Russ.).
<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-45-54>
 21. Кулябина ЕВ, Щекотихин АЕ, Тевяшова АН, Кулябина ТВ, Морозова ВВ. Стандартные образцы состава фармацевтических субстанций противомикробных препаратов. *Эталоны. Стандартные образцы*. 2023;19(4):17–26.
Kulyabina EV, Shchekotikhin AE, Tevyashova AN, Kulyabina TV, Morozova VV. Reference materials for the composition of antimicrobial substances. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(4):17–26 (In Russ.).
<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-4-17-26>
 22. Гегечкори ВИ, Шульга НА, Князев АМ, Чадова НН, Шестаков ВН. Создание стандартных образцов утвержденного типа для примесей активных фармацевтических субстанций. В кн.: *Стандартные образцы в измерениях и технологиях. Тезисы докладов V Международной научной конференции*. Екатеринбург; 2022. С. 45–6.
Gegechkori VI, Shulga NA, Knyazev AM, Chadova NN, Shestakov VN. Creation of certified reference materials for impurities of active pharmaceutical ingredients. *Reference materials in measurement and technology. Abstracts of the V International Scientific*

- Conference. Ekaterinburg; 2022. P. 45–6 (In Russ.).
EDN: [IDIKGA](#)
23. Гегечкори ВИ, Шатилина АА, Щепочкина ОЮ, Раменская ГВ. Разработка методики количественного определения протеолитической активности стандартного образца панкреатина. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2023;26(12):25–31.
Gegechkori VI, Shatilina AA, Shchepochkina OYu, Ramenskaya GV. Proposal of the method for quantitative determination of proteolytic activity of a pancreatin reference standard. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2023;26(12):25–31 (In Russ.).
EDN: [QRJRSJ](#)
24. Волкова РА. Методики контроля или методики испытаний — к вопросу о метрологическом обеспечении аналитических методик. *Справочник заведующего КДЛ*. 2013;(4):4–9.
Volkova RA. Control methods or testing methods — on the issue of metrological support for analytical methods. *Handbook of the Head of CDL*. 2013;(4):4–9 (In Russ.).
EDN: [QBPDNB](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Р.А. Волкова** — концепция исследования, написание и редактирование текста рукописи; **О.В. Фадейкина** — обобщение материалов исследования, обсуждение текста рукописи, подготовка и редактирование текста рукописи; **О.Б. Устинникова** — обсуждение и подготовка текста рукописи; **К.А. Саркисян** — обсуждение и редактирование текста рукописи; **А.А. Мовсисянц** — критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; **В.А. Меркулов** — критическое обсуждение текста рукописи; **В.В. Косенко** — критическое обсуждение и 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. **R.A. Volkova** conceptualised the study, drafted and edited the manuscript. **O.V. Fadeikina** summarised the study materials; prepared, discussed and edited the manuscript. **O.B. Ustinnikova** discussed and drafted the manuscript. **K.A. Sarkisyan** discussed and edited the manuscript. **A.A. Movsesyants** critically discussed and edited the manuscript. **V.A. Merkulov** critically discussed the manuscript and approved the final version for publication.

Об авторах / Authors

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

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

Саркисян Каринэ Арташесовна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0445-7086>
sarkisyan@expmed.ru

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

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

Поступила 10.11.2023
После доработки 27.02.2024
Принята к публикации 29.02.2024

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

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

Karine A. Sarkisyan, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0445-7086>
sarkisyan@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

Received 10 November 2023
Revised 27 February 2024
Accepted 29 February 2024



Аттестация фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности рекомбинантного интерферона α -2b

Л.А. Гайдерова , Ю.Н. Лебедева, Т.Н. Лобанова, Э.К. Липатова, Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина

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

✉ Гайдерова Лидия Александровна; gaiderova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ. Методика определения специфической активности рекомбинантных интерферонов предусматривает использование стандартного образца в качестве меры сравнения. Доступность международного стандартного образца (МСО), обычно используемого для оценки качества препаратов указанного типа, в настоящее время ограничена, в связи с чем при оценке качества интерферонов целесообразно применять фармакопейные стандартные образцы (ФСО), которые предварительно аттестуют с использованием МСО при их наличии.

ЦЕЛЬ. Аттестация фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности рекомбинантного интерферона α -2b.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Определение специфической активности проводили в реакции подавления интерфероном цитопатического действия вируса на культуре клеток в сравнении с активностью МСО интерферона α -2b (WHO International Standard Interferon alpha 2b (Human, rDNA derived)). В исследовании использовали клетки линий A549 и MDBK в комбинации с вирусами везикулярного стоматита (VSV) и энцефаломиокардита (ЕМС). Исследование проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ОФС.1.7.2.0002.15). Учет результатов осуществляли инструментальным и визуальным методами. При расчетах использовали методы математической статистики; учет влияния факторов промежуточной прецизионности проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В соответствии с разработанной программой и методикой аттестации проведена аттестация ФСО человеческого рекомбинантного интерферона α -2b (ФСО чРИФН- α -2b), предназначенного для оценки качества соответствующего препарата по показателям «Специфическая активность» (определение противовирусной активности на культуре клеток), «Подлинность» (реакция нейтрализации). Входной контроль кандидата в ФСО по показателям спецификации подтвердил его соответствие требованиям нормативной документации. По результатам испытаний установлено значение специфической активности ФСО: $4,47 \times 10^8$ МЕ/мл, расширенная неопределенность: $8,12 \times 10^7$ МЕ/мл (коэффициент охвата 2, уровень доверия ~95%). Срок годности ФСО чРИФН- α -2b установлен по сроку годности соответствующего препарата при хранении при температуре не выше минус 40 °С. Допускается хранение размороженного ФСО при температуре 2–8 °С в течение 1 мес.

ВЫВОДЫ. Аттестован ФСО для оценки специфической активности рекомбинантного интерферона α -2b. По результатам аттестации ФСО включен в Реестр фармакопейных стандартных образцов Государственной фармакопеи Российской Федерации с реестровым номером ФСО.3.2.00455 и наименованием «Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (специфическая активность)». Внедрение аттестованного ФСО

чРИН- α -2b позволит проводить оценку качества всех отечественных препаратов интерферона указанного типа по показателям «Специфическая активность», «Подлинность» на надлежащем научно-методическом уровне и обеспечит независимость отечественных производителей и органов контроля качества препаратов от импорта МСО.

Ключевые слова: рекомбинантный интерферон α -2b; чРИН- α -2b; специфическая активность; противовирусная активность; фармакопейный стандартный образец; ФСО; аттестация ФСО; расширенная неопределенность

Для цитирования: Гайдерова Л.А., Лебедева Ю.Н., Лобанова Т.Н., Липатова Э.К., Волкова Р.А., Фадейкина О.В. Аттестация фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности рекомбинантного интерферона α -2b. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):21–31. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-21-31>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

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

Certification of a pharmacopoeial reference standard for potency testing of recombinant interferon α -2b

Lidia A. Gaiderova✉, Yulia N. Lebedeva, Tatiana N. Lobanova, Elvira K. Lipatova, Rauza A. Volkova, Olga V. Fadeikina

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

✉ Lidia A. Gaiderova; gaiderova@expmed.ru

ABSTRACT

SCIENTIFIC RELEVANCE. Potency testing of recombinant interferons requires a reference standard. The availability of International Standards (ISs) that are commonly used to assess the quality of recombinant interferons is currently limited. Therefore, the quality of interferons should be assessed using pharmacopoeial reference standards (RSs) certified using ISs (if available).

AIM. This study aimed to certify a pharmacopoeial RS for potency testing of recombinant interferon α -2b.

MATERIALS AND METHODS. The potency determination involved comparing the inhibition of the virus-induced cytopathic effect observed in cell culture with the candidate RS and the WHO International Standard for Human rDNA-derived interferon α -2b. The study used A-549 and MDBK cell lines with encephalomyocarditis (EMC) and vesicular stomatitis (VSV) viruses. The authors followed the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (Cell-Culture Bioassays for Interferon Products, OFS.1.7.2.0002.15). The results were recorded using instrumental and visual methods. The calculations used mathematical statistics. To factor in the influence of intermediate precision, the authors applied Student's *t*-test.

RESULTS. The authors developed a certification programme and procedure and certified the pharmacopoeial RS for recombinant human interferon α -2b (rhIFN α -2b) to identify the corresponding medicinal products (by virus neutralisation) and test their potency (by antiviral activity in cell culture). Upon receipt, the candidate RS was verified for compliance with regulatory specifications. According to the test results, the potency of the candidate pharmacopoeial RS was 4.47×10^8 IU/mL, and the expanded uncertainty was 8.12×10^7 IU/mL, with a coverage factor of $k=2$ and a confidence level of 95%. The pharmacopoeial RS for rhIFN α -2b was considered to have the same shelf-life period as the corresponding medicinal products if stored at a temperature not higher than -40°C . When thawed, the pharmacopoeial RS for rhIFN α -2b can be stored at a temperature of $2-8^\circ\text{C}$ for up to 1 month.

CONCLUSIONS. Upon certification for potency testing, the pharmacopoeial RS for rhIFN α -2b has been included in the Register of Reference Standards of the Russian Pharmacopoeia as Recombinant Human Interferon α -2b (Potency) FSO.3.2.00455. The introduction of this pharmacopoeial RS will help to conduct the identification and potency testing of all Russian interferon α -2b products at an appropriate scientific and methodological level. As a result, Russian pharmaceutical manufacturers and quality control agencies will no longer depend on imported ISs.

Keywords: recombinant interferon α -2b; rhIFN α -2b; potency; antiviral activity; pharmacopoeial reference standard; reference standard certification; expanded uncertainty

For citation: Gaiderova L.A., Lebedeva Yu.N., Lobanova T.N., Lipatova E.K., Volkova R.A., Fadeikina O.V. Certification of a pharmacopoeial reference standard for potency testing of recombinant interferon α -2b. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):21–31. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-21-31>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00026-24-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D reporting No. 124022200103-5).

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

Введение

Стандартные образцы (СО) выполняют важную роль в системе производства и обеспечения качества биотехнологических лекарственных препаратов (БТЛП). Они служат мерой сравнения при оценке показателей качества при контроле готовой и промежуточной продукции, а также при стандартизации методов контроля в научно-исследовательских и контролирующих организациях, что позволяет оценивать сопоставимость результатов в различных лабораториях, выпускать качественную продукцию и обеспечивать безопасность и эффективность биологических препаратов при их клиническом применении [1–4].

При производстве и контроле качества БТЛП применяют международные стандартные образцы (МСО) Всемирной организации здравоохранения¹ [5]. Однако МСО имеют высокую стоимость, а кроме того, их производят в ограниченном количестве, что снижает доступность МСО, особенно в условиях санкций в отношении Российской Федерации. В связи с этим для оценки качества при производстве и испытании БТЛП для подтверждения их соответствия требованиям нормативной документации (НД) целесообразно применять вторичные СО, аттестацию которых проводят с использованием МСО, например фармакопейные стандартные образцы (ФСО) [5–7]. В свою очередь, ФСО

также могут быть использованы для аттестации стандартного образца предприятия (СОп).

Аттестация СО – исследование, имеющее целью определение значений метрологических характеристик в соответствии с программой и методикой аттестации, с последующим включением полученных результатов в паспорт СО [6]. В соответствии с требованиями международных² и российских³ стандартов первоочередной этап определения значений аттестуемых характеристик СО – разработка программы и методики аттестации. Аттестуемая характеристика СО БТЛП, как правило, – это показатель специфической активности, титр или концентрация микроорганизмов, содержание активного действующего компонента. Необходимые характеристики СО – однородность, стабильность и срок годности [6].

Ранее авторами данной статьи была проведена разработка отраслевого СО для оценки специфической активности препаратов лейкоцитарного интерферона альфа (ИФН- α) [7]. В настоящее время препараты указанной группы сняты с производства и все больше используются рекомбинантные БТЛП, активным компонентом которых являются цитокины и, в частности, ИФН [8]. В Российской Федерации зарегистрировано 23 отечественных препарата на основе человеческого рекомбинантного интерферона-альфа-2b (чрИФН- α -2b)⁴, которые используются

¹ Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. Annex 2. WHO Technical Report Series, No. 932. WHO; 2006.

² ISO Guide 35:2017. Reference materials. Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability. Geneva: ISO; 2017.

³ ГОСТ 8.315-2019. Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения.

ГОСТ Р ИСО 17034-2021. Общие требования к компетентности производителей стандартных образцов.

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

для лечения различных заболеваний вирусной этиологии.

Специфическая активность (противовирусная активность) — один из важнейших показателей качества препаратов на основе рекомбинантных интерферонов, который отражает их механизм действия и эффективность. Методика определения этого показателя предусматривает использование культур клеток, чувствительных к ИФН, вируса-индикатора и СО в качестве меры сравнения. Важное условие адекватного определения специфической активности — стандартность всех вышеперечисленных компонентов, в том числе использование различными производителями препаратов ИФН стандартного образца, обеспечивающего единство измерений [8].

В связи с введением международных санкций особую актуальность приобретает разработка и аттестация ФСО для оценки активности чРИФН- α -2b, что позволит обеспечить независимость отечественных производителей и органов контроля качества препаратов от импорта МСО и снижение затрат на производство.

Цель работы — аттестация фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности рекомбинантного интерферона α -2b.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- разработка программы и методики аттестации;
- подтверждение соответствия кандидата в ФСО требованиям НД (входной контроль);
- определение значения аттестованной характеристики ФСО и неопределенности аттестованного значения;
- определение срока годности ФСО;
- разработка сопроводительной документации (проект паспорта, макет этикетки первичной и вторичной упаковки, инструкция по применению ФСО).

Материалы и методы

Материалы

Стандартный образец. МСО чРИФН- α -2b (WHO International Standard: Interferon alpha 2b (Human rDNA derived), NIBSC code: 95/656⁵).

Материал кандидата в фармакопейный стандартный образец. Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, безметиониновый — субстанция-раствор концентрированный, замороженный (ФС-001808-280422) производства ООО «Фирн М» (Россия). Дата выпуска — 20.06.2022. Срок годности до 06.2024.

Культуры клеток:

- клеточная линия карциномы легких человека A549 (ATCC, США, кат. № CCL-185) получена из коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; клетки поддерживали в рабочей коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России;
- перевиваемая клеточная линия почки быка MDBK (NBL-1) получена из коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; клетки поддерживали в рабочей коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Для аттестации ФСО рекомендовано использовать 3–30-й пассаж клеток.

Индикаторные вирусы:

- вирус энцефаломиокардита (ЕМС) получен из коллекции ATCC (ATCC, США, кат. № VR 129B); вирус поддерживали на культуре клеток Vero (коллекция ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России);
- вирус везикулярного стоматита (VSV), штамм «Индиана» (№ 29) получен из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского) Минздрава России; вирус поддерживали на культуре клеток MDBK (коллекция ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России).

Реактивы и материалы. В работе использовали следующие основные реактивы: эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США), раствор трипанового синего 0,4% (Macklin, Китай), краситель нафтол сине-черный (Sigma-Aldrich, США), уксусная кислота ледяная (Sigma-Aldrich, США), формальдегид 37% (Sigma-Aldrich, США), натрия ацетат тригидрат (Fisher Chemical, Великобритания), натрия гидроксид (Fisher Chemical, Великобритания), а также реактивы производства ООО НПП «ПанЭко» (Россия): питательная среда DMEM, жидкая без глутамина, с глюкозой (4,5 г/л); L-глутамин; гентамицин, 10 мг/мл; раствор Версена; трипсин-ЭДТА. В работе использовали материалы производства Corning (США): планшеты культуральные 96-, 24-, 12- и 6-луночные стерильные; стерильные пробирки пластиковые конические вместимостью 15 и 50 мл; стерильные пипетки объемом 1, 2, 10, 25 и 50 мл; чашки Петри культуральные стерильные 100 мм.

Оборудование

Холодильник POZIS XF-400-2 (ПАО «СЭЗ им. Серго Орджоникидзе», Россия); морозильник MDF-U 3386S (Panasonic, Япония); CO₂-инкубатор

⁵ <https://nibsc.org/documents/ifu/95-656.pdf>

МСО-15АС (Sanyo Electric, Япония); шкаф ламинарный БАВп-01-1,2 (ЗАО «Ламинаторные системы», Россия); микроскоп инвертированный EVOS® XL (Thermo Fisher Scientific, США); термостат ST-3L (Elmi, Латвия); центрифуга 5804 R (Eppendorf, Германия); дозатор Biohit Midi Plus (Sartorius, Финляндия); камера Горяева (ООО «МиниМед», Россия).

Методы

При аттестации кандидата в ФСО чРИФН- α -2b по показателю «Специфическая активность» исследовали его противовирусную активность биологическим методом в реакции подавления интерфероном цитопатического действия вируса на культуре клеток в соответствии с ОФС.1.7.2.0002.15⁶. Испытания проводили два аналитика в разные дни с использованием различных комбинаций клеток (MDBK, А549) и вирусов (VSV, EMC), чувствительных к ИФН (табл. 1).

Проведение анализа. Каждый образец чРИФН- α -2b анализировали в 4 повторностях (независимые разведения образца вносились в отдельный планшет). Предварительно образцы кандидата в ФСО и МСО разводили до концентрации 100 МЕ/мл.

Далее использовали 3 варианта проведения испытаний, отличающихся применением различных комбинаций вида клеток и вирусов, порядком внесения испытуемых образцов (кандидата в ФСО и МСО) до и после образования монослоя, способом учета результатов:

- 1) *клетки А549, вирус EMC, инструментальный учет* – готовили серию двукратных разведений чРИФН- α -2b в планшете для предварительных разведений, вносили их в 96-луночный планшет с предварительно сформированным монослоем клеток;
- 2) *клетки MDBK, вирус VSV, визуальный учет* – разведение чРИФН- α -2b проводили непосредственно в планшетах с уже сформировавшимся монослоем клеток;
- 3) *клетки MDBK, вирус VSV, инструментальный учет* – образцы разведенного чРИФН- α -2b вносили в планшеты одновременно с суспензией клеток, при этом клеточный монослой формировался в присутствии интерферона.

В каждом варианте оставляли в планшете два ряда с питательной средой для контроля клеток и вируса.

Планшеты инкубировали при 37 °С в течение 24 ч в атмосфере, содержащей (5,0±0,5)% CO₂.

После инкубирования культур клеток и удаления культуральной среды добавляли в лунки по 100 мкл раствора индикаторного вируса в рабочей дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл (ТЦД₅₀ – тканевая цитопатическая доза вируса, вызывающая гибель 50% клеток). В лунки, предназначенные для контроля клеток и вируса, вносили по 100 мкл поддерживающей среды.

На контрольном планшете предусматривали 16 лунок для подтверждения дозы вируса, в которые вносили по 100 мкл разведений вируса, соответствующих 100, 10, 1 и 0,1 ТЦД₅₀/0,1 мл. Затем планшеты инкубировали при 37 °С в течение 24–48 ч в атмосфере, содержащей (5,0±0,5)% CO₂.

Учет и оценка результатов. Результаты испытания подлежали учету, если выполнялись следующие три условия:

- в лунках с контролем клеток, в лунках, содержащих максимальное количество интерферона, и в лунках с индикаторным вирусом в дозе 0,1 ТЦД₅₀/0,1 мл не наблюдается поражения клеточного монослоя вирусом;
- в лунках с клетками без интерфероновой защиты, подвергшимися действию вируса в заражающей дозе 100 ТЦД₅₀, и в лунках, содержащих минимальное количество интерферона, наблюдается полное поражение клеточного монослоя вирусом;
- доза внесенного вируса составляет 100 ТЦД₅₀ в 0,1 мл.

Визуальный учет активности интерферона.

В планшетах с испытуемыми образцами с помощью инвертированного микроскопа подсчитывали число лунок в каждом разведении для растворов кандидата в ФСО и МСО, в которых наблюдалась защита клеточного монослоя от цитопатического действия вируса.

Для каждого планшета рассчитывали титр МСО (Т_{МСО}) и кандидата в ФСО (Т_{кФСО}), используя метод Спирмена–Кербера⁷:

$$T_{\text{кФСО}} = 2^{\log_2 ED_{50\text{кФСО}}}, \quad (1)$$

$$T_{\text{МСО}} = 2^{\log_2 ED_{50\text{МСО}}}, \quad (2)$$

$$\log_2 ED_{50} = D_{\text{max}} + \frac{d}{n} \times \left(p - \frac{n}{2} \right), \quad (3)$$

где Т_{кФСО} – титр кандидата в ФСО; Т_{МСО} – титр МСО; ED₅₀ – 50%-ная эффективная доза противовирусной активности; D_{max} – двоичный логарифм фактора разведения, ниже которого наблюдается защита клеток от цитопатического действия вируса (отсутствие признаков деградации

⁶ ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т.2; 2018.

⁷ Там же.

монослоя) в 100% лунок; d — двоичный логарифм шага разведений ($=1$); n — число лунок, приходящееся на каждое разведение; p — число лунок для разведения, соответствующего $D_{\max}$, и последующих разведений, в которых наблюдается защита клеток от цитопатического действия вируса (отсутствие признаков дегенерации монослоя).

Для каждого рабочего планшета рассчитывали специфическую активность кандидата в ФСО ($A_{\text{кФСО}}$) по формуле:

$$A_{\text{кФСО}} = A_{\text{МСО}} \times \frac{T_{\text{кФСО}}}{T_{\text{МСО}}}, \quad (4)$$

где $A_{\text{кФСО}}$ — специфическая активность кандидата в ФСО; $A_{\text{МСО}}$ — номинальная специфическая активность МСО; $T_{\text{кФСО}}$ — титр кандидата в ФСО; $T_{\text{МСО}}$ — титр МСО.

Специфическую активность образца рассчитывали как среднее арифметическое по всем повторностям.

Инструментальный учет активности интерферона. При выполнении перечисленных ранее трех условий, допускающих учет результатов, по окончании инкубирования проводили окрашивание клеток (краситель нафтол син-черный), результаты которого регистрировали путем измерения оптической плотности растворов в лунках с использованием планшетного спектрофотометра.

Специфическую активность испытуемых образцов рассчитывали с помощью модели параллельных линий. Принцип ее основан на том, что обычно в интервале применяемых доз количественный ответ связан линейно с логарифмом дозы. По результатам измерения строили графики «доза — ответ», представляющие собой зависимость значений оптической плотности, соответствующих испытуемым образцам кандидата в ФСО и МСО, от логарифма их разведения. Специфическую активность определяли на основе сравнения линий дозозависимости МСО и кандидата в ФСО. Обработку результатов испытаний и расчет величины специфической активности проводили с помощью программного обеспечения PLA 3.0 (Stegmann Systems, Германия). Значение показателя «Специфическая активность» рассчитывали как среднее арифметическое по всем повторностям.

Статистическая обработка результатов. С использованием программы Microsoft Office Excel рассчитывали показатели описательной статистики: среднее арифметическое значение

($X_{\text{ср}}$), стандартное отклонение (S), относительное стандартное отклонение (RSD).

Значение аттестованной характеристики ФСО чРИФН- α -2b представляли в виде:

$$A_{\text{ФСО}} = A_{\text{ср}} \pm U, \quad (5)$$

где $A_{\text{ФСО}}$ — специфическая активность ФСО чРИФН- α -2b; $A_{\text{ср}}$ — среднее арифметическое ($X_{\text{ср}}$) значение показателя «Специфическая активность»; U — расширенная неопределенность, рассчитанная как $\pm 2S$ (два стандартных отклонения результатов испытаний, полученных в условиях промежуточной прецизионности).

Статистическую значимость (или незначимость) различий двух групп данных для оценки возможности объединения экспериментальных данных, полученных при учете влияния факторов промежуточной прецизионности (клетки MDBK, вирус VSV; клетки A549, вирус EMC; инструментальный/визуальный метод учета; аналитик) проводили с помощью t -критерия Стьюдента при уровне значимости $\alpha=0,5$ и соответствующего числа степеней свободы, рассчитываемого по формуле $df = n_1 + n_2 - 2$ [9].

Результаты и обсуждение

В соответствии с разработанной программой и методикой аттестации провели оценку качества (входной контроль) кандидата в ФСО чРИФН- α -2b, а затем испытания его образцов по показателю «Специфическая активность» для установления значения аттестованной характеристики.

Входной контроль кандидата в ФСО на соответствие требованиям НД⁸ проведен согласно спецификации. Показатель «Специфическая активность» определяли с использованием МСО.

Результаты испытаний подтвердили соответствие материала кандидата в ФСО требованиям НД по проверенным показателям качества: описание (визуальный метод), подлинность (методы — реакция нейтрализации противовирусной активности анти-альфа-интерфероновыми антителами, изоэлектрическое фокусирование, пептидное картирование, обращенно-фазовая ВЭЖХ, электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях), прозрачность (визуальный метод), цветность (визуальный метод), pH (потенциометрический метод), белок (метод Лоури), стерильность (метод прямого посева), специфическая активность (определение противовирусной активности на культуре клеток), удельная активность (расчетный метод),

⁸ НД № ФС-001808-280422, Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, безметиониновый — субстанция-раствор концентрированный, производства ООО «Фирн М».

Таблица 1. Варианты проведения испытаний кандидата в фармакопейный стандартный образец для оценки специфической активности человеческого рекомбинантного интерферона α -2b
Table 1. Testing arrangement for the candidate pharmacopoeial reference standard for potency testing of human recombinant interferon α -2b

Вариант испытания Test variant	Материал (клетки, вирус) Material (cells, viruses)	Метод учета Recording method	$C_{кл}$, тыс. кл./мл C_{cells} , thousand cells/mL	Время инкубирования клеточной суспензии, ч Incubation time for cell suspensions, h	Доза вносимого вируса, ТЦД ₅₀ /0,1 мл Viral inoculum dose, TCID ₅₀ /0.1 mL	Индикатор-краситель Indicating dye	Число испытаний Number of tests
1	MDBK, VSV	Инструментальный Instrumental	200	1–1,5	100	Нафтол сине-черный Naphthol blue black	12
2	A549, EMC	Инструментальный Instrumental	250	24	100	Нафтол сине-черный Naphthol blue black	8
3	MDBK, VSV	Визуальный Visual	250	24	100	Без окрашивания No staining	10

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

Примечание. Варианты испытаний человеческого рекомбинантного интерферона α -2b, чРИФН- α -2b (каждый вариант испытывали по 2 аналитика): 1 – предварительно подготовленная в отдельном планшете серия двукратных разведений чРИФН- α -2b вносится в другой планшет с уже сформированным монослоем клеток; 2 – разведение чРИФН- α -2b непосредственно в планшетах с уже сформировавшимся монослоем клеток; 3 – внесение разведенного чРИФН- α -2b в планшеты одновременно с суспензией клеток, клеточный монослой формируется в присутствии интерферона. Клетки: MDBK – перевиваемая клеточная линия почки быка, A549 – клеточная линия карциномы легких человека; вирусы: VSV – вирус везикулярного стоматита, штамм «Индиана» (№ 29), EMC – вирус энцефаломиокардита (№ VR-129B); $C_{кл}$ – концентрация клеточной суспензии, вносимой в 96-луночный планшет, тыс. клеток на 1 мл (тыс. кл./мл); ТЦД₅₀ – тканевая цитопатическая доза вируса, вызывающая гибель 50% клеток.
Note. Testing arrangement for human recombinant interferon α -2b (rhIFN α -2b), with each test conducted by 2 analysts: 1, serial two-fold dilution of rhIFN α -2b prepared on one plate and inoculated onto another plate with a pre-formed cell monolayer; 2, rhIFN α -2b diluted directly on the plate with a formed cell monolayer; 3, diluted rhIFN α -2b plated simultaneously with the cell suspension forming a monolayer in the presence of rhIFN α -2b. Cells: MDBK, Madin–Darby bovine kidney; A549, adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells. Viruses: VSV, vesicular stomatitis virus, Indiana serotype (National Virus Collection, 29); EMC, encephalomyocarditis virus (ATCC, VR-129B). C, concentration of the cell suspension for inoculation onto 96-cell plates (thousand cells per 1 mL); TCID₅₀, tissue culture infectious dose requires to kill 50% of inoculated cells.

белковые примеси (электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях), родственные примеси (обращенно-фазовая ВЭЖХ).

Испытания кандидата в фармакопейный стандартный образец для оценки показателя «Специфическая активность» и установление значения аттестованной характеристики

Аттестуемой характеристикой является специфическая активность, так как исследуемый кандидат в ФСО чРИФН- α -2b предназначен для оценки специфической (противовирусной) активности препаратов интерферона и выражения ее в международных единицах (МЕ).

Испытания проводили в различных условиях с использованием наиболее часто встречающихся в НД производителей сочетаний клетки/вирус (табл. 1). В испытаниях участвовало 2 аналитика, получено 30 независимых результатов. В таблицах 2 и 3 представлены результаты испытаний и статистической обработки полученных данных.

Проведенный статистический анализ результатов определения специфической активности кандидата в ФСО, полученных

в условиях промежуточной прецизионности (табл. 3), показал, что во всех случаях значения t -критерия Стьюдента, рассчитанные по экспериментальным данным ($t_{эксп}$), меньше критического табличного значения $t_{табл}$ ($df; 0,05$) при уровне значимости 0,05 и соответствующего для каждой сравниваемой групп числа степеней свободы. Это означает, что результаты, полученные разными аналитиками, разными методами с использованием разных культур клеток и вирусов не имеют статистически значимых различий, что позволило объединить все экспериментальные данные и использовать их для расчета значения аттестованной характеристики.

Среднее значение специфической активности ($A_{ФСО}$) исследуемых образцов, стандартное отклонение (S) и относительное стандартное отклонение (RSD) рассчитаны на основе результатов, приведенных в столбце $A_{ср}$ таблицы 2.

Таким образом, значение аттестованной характеристики ФСО чРИФН- α -2b ($A_{ФСО}$), установленное относительно МСО, составило $4,470 \times 10^8$ МЕ/мл, стандартное отклонение (S) – $4,059 \times 10^7$ МЕ/мл, RSD – 9,08%; расширенная неопределенность аттестованного значения

Таблица 2. Результаты определения специфической активности кандидата в фармакопейный стандартный образец человеческого рекомбинантного интерферона α-2b

Table 2. Results of potency testing of the candidate pharmacopoeial reference standard for human recombinant interferon α-2b

№ п/п Item No.	Фактор промежуточной прецизионности (клетки, вирус, метод учета, аналитик) Intermediate precision factor (cell line, virus, result recording method, analyst)	Число образцов, n Number of samples, n	A _{ср} , МЕ/мл Average potency, IU/mL	S, МЕ/мл S, IU/mL	RSD, %
1	MDBK, VSV Инструментальный учет Аналитик 1 MDBK, VSV Instrumental method Analyst 1	n ₁ =6	4,659×10 ⁸	3,637×10 ⁷	7,8
2	MDBK, VSV Инструментальный учет Аналитик 2 MDBK, VSV Instrumental method Analyst 2	n ₂ =6	4,559×10 ⁸	2,279×10 ⁷	5,0
3	A549, EMC Инструментальный учет Аналитик 1 A549, EMC Instrumental method Analyst 1	n ₁ =3	4,644×10 ⁸	4,2×10 ⁷	9,1
4	A549, EMC Инструментальный учет Аналитик 2 A549, EMC Instrumental method Analyst 2	n ₂ =5	4,068×10 ⁸	3,659×10 ⁷	9,0
5	MDBK, VSV Визуальный учет Аналитик 1 MDBK, VSV Visual method Analyst 1	n ₁ =5	4,332×10 ⁸	3,485×10 ⁷	8,04
6	MDBK, VSV Визуальный учет Аналитик 2 MDBK, VSV Visual method Analyst 2	n ₂ =5	4,574×10 ⁸	5,400×10 ⁷	11,8

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

Примечание. n₁ – число образцов, исследуемых аналитиком 1; n₂ – число образцов, исследуемых аналитиком 2; A_{ср} – среднее арифметическое значение показателя «Специфическая активность»; S – стандартное отклонение значений показателя; RSD – относительное стандартное отклонение; клетки: MDBK – перевиваемая клеточная линия почки быка, A549 – клеточная линия карциномы легких человека; вирусы: VSV – вирус везикулярного стоматита, штамм «Индиана» (№ 29), EMC – вирус энцефаломиокардита (№ VR 129B).

Note. n₁, number of samples tested by analyst 1; n₂, number of samples tested by analyst 2; S, standard deviation; RSD, relative standard deviation. Cells: MDBK, Madin–Darby bovine kidney; A549, human lung adenocarcinoma cells. Viruses: VSV, vesicular stomatitis virus, Indiana serotype (National Virus Collection, 29); EMC, encephalomyocarditis virus (ATCC, VR-129B).

для коэффициента охвата k=2 и уровня доверия ~95% (U=2S) – 8,118×10⁷ МЕ/мл.

Полученные авторами результаты исследования на двух системах клетки/вирус (A549/EMC и MDBK/VSV) полностью подтверждаются данными исследований зарубежных авторов на значительно большем количестве сочетаний клетки/вирус [4], что позволяет использовать аттестованный нами ФСО на любых клетках, чувствительных к рИФН-α-2b.

Оценка стабильности и установление срока годности фармакопейного стандартного образца

Для оценки стабильности размороженного ФСО крИФН-α-2b провели испытания 10 образцов по показателю «Специфическая активность» после их хранения при температуре 2–8 °С в течение 1 мес. Рассчитанные по экспериментальным данным среднее значение активности A_{ср}=4,614×10⁸ МЕ/мл и значения статистических показателей, характеризующих ее неопределенность (S=6,686×10⁷ МЕ/мл,

Таблица 3. Результаты статистического анализа результатов испытаний с *t*-критерием Стьюдента
Table 3. Statistical analysis of test results using Student's *t*-test

Метод учета результатов, клетки, вирус, аналитик <i>Result recording method, cell line, virus, analyst</i>	Наименование фактора промежуточной прецизионности <i>Intermediate precision factor</i>	Число испытаний <i>Number of tests</i>	Число степеней свободы, <i>df</i> <i>Number of degrees of freedom, df</i>	Значение <i>t</i> -критерия Стьюдента, рассчитанное по экспериментальным данным, $t_{\text{эксп}}$ <i>Student's t-test value for experimental data, t_{exp}</i>	Критическое значение <i>t</i> -критерия Стьюдента, $t_{\text{табл}}(df;0,05)$ <i>Critical value of Student's t-test, $t_{\text{crit}}(df;0,05)$</i>	Достигнутый уровень значимости, <i>p</i> <i>Achieved level of significance, p-value</i>	Вывод о статистической значимости/незначимости различий <i>Conclusion on statistical significance/insignificance of differences</i>
Сравнение результатов, полученных разными аналитиками <i>Comparison of results obtained by different analysts</i>							
Инструментальный учет, MDBK, VSV <i>Instrumental method, MDBK, VSV</i>	Аналитик 1 <i>Analyst 1</i>	$n_{\text{аналитик1}}=6$ $n_{\text{analyst1}}=6$	10	0,5718	$t_{\text{табл}}(df = 10;0,05)=2,2281$ $t_{\text{crit}}(df = 10;0,05)=2,2281$	0,5801	Не значимо <i>Insignificant</i>
	Аналитик 2 <i>Analyst 2</i>	$n_{\text{аналитик2}}=6$ $n_{\text{analyst2}}=6$					
Инструментальный учет, A549, EMC <i>Instrumental method, A549, EMC</i>	Аналитик 1 <i>Analyst 1</i>	$n_{\text{аналитик1}}=3$ $n_{\text{analyst1}}=3$	6	1,9612	$t_{\text{табл}}(df = 6;0,05)=2,447$ $t_{\text{crit}}(df = 6;0,05)=2,447$	0,0868	Не значимо <i>Insignificant</i>
	Аналитик 2 <i>Analyst 2</i>	$n_{\text{аналитик2}}=5$ $n_{\text{analyst2}}=5$					
Визуальный учет, MDBK, VSV <i>Visual method, MDBK, VSV</i>	Аналитик 1 <i>Analyst 1</i>	$n_{\text{аналитик1}}=5$ $n_{\text{analyst1}}=5$	8	0,8440	$t_{\text{табл}}(df = 8;0,05)=2,306$ $t_{\text{crit}}(df = 8;0,05)=2,306$	0,4232	Не значимо <i>Insignificant</i>
	Аналитик 2 <i>Analyst 2</i>	$n_{\text{аналитик2}}=5$ $n_{\text{analyst2}}=5$					
Сравнение результатов, полученных инструментальным методом с использованием культуры клеток MDBK/вирус VSV и культуры клеток A549/вирус EMC <i>Comparison of results recorded instrumentally using MDBK/VSV and A549/EMC combinations</i>							
Инструментальный учет, Аналитик 1, 2 <i>Instrumental method, Analyst 1, 2</i>	MDBK, VSV <i>MDBK, VSV</i>	$n_{\text{аналитик1,2}}=12$ $n_{\text{analyst1,2}}=12$	18	1,7567	$t_{\text{табл}}(df = 18;0,05)=2,101$ $t_{\text{crit}}(df = 18;0,05)=2,101$	0,0702	Не значимо <i>Insignificant</i>
	A549, EMC <i>A549, EMC</i>	$n_{\text{аналитик1,2}}=8$ $n_{\text{analyst1,2}}=8$					
Сравнение результатов, полученных инструментальным и визуальным методом <i>Comparison of results recorded by instrumental and visual methods</i>							
Аналитик 1, 2, MDBK, VSV A549, EMC <i>Analyst 1, 2 MDBK, VSV A549, EMC</i>	Инструментальный учет <i>Instrumental method</i>	$N_{\text{инстр}}=20$ $N_{\text{instrumental}}=20$	28	1,1589	$t_{\text{табл}}(df = 28;0,05)=2,048$ $t_{\text{crit}}(df = 28;0,05)=2,048$	0,8695	Не значимо <i>Insignificant</i>
	Визуальный учет <i>Visual method</i>	$N_{\text{визуальный}}=10$ $N_{\text{visual}}=10$					

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

Примечание. Клетки: MDBK — перевиваемая клеточная линия почки быка, A549 — клеточная линия карциномы легких человека; вирусы: VSV — вирус везикулярного стоматита, штамм «Индиана» (№ 29), EMC — вирус энцефаломиокардита (№ VR 129B).
Note. Cells: MDBK, Madin–Darby bovine kidney; A549, human lung adenocarcinoma cells. Viruses: VSV, vesicular stomatitis virus, Indiana serotype (National Virus Collection, 29); EMC, encephalomyocarditis virus (ATCC, VR-129B).

RSD=14,49%), входят в интервал значений аттестованной характеристики (от 3,67 до 6,27 МЕ/мл) и подтверждают стабильность размороженного СО.

Срок годности ФСО чРИФН- α -2b установлен по сроку годности соответствующего препарата при хранении при температуре не выше минус 40 °С.

Выводы

1. Аттестован фармакопейный стандартный образец для оценки специфической активности человеческого рекомбинантного интерферона α -2b. Значение аттестованной характеристики фармакопейного стандартного образца активности человеческого рекомбинантного интерферона α -2b, установленное относительно международного стандартного образца, составило $4,47 \times 10^8$ МЕ/мл, расширенная неопределенность: $8,12 \times 10^7$ МЕ/мл (коэффициент охвата 2; уровень доверия ~95%).
2. Подтверждена стабильность размороженного фармакопейного стандартного образца по показателю «Специфическая активность» после хранения в течение 1 мес. при температуре 2–8 °С.
3. Установлен срок годности аттестованного фармакопейного стандартного образца активности человеческого рекомбинантного интерферона α -2b при хранении при температуре не выше минус 40 °С.
4. Разработана и утверждена в установленном порядке сопроводительная документация (паспорт, макет этикетки первичной и вторичной упаковки, инструкция по применению ФСО).
5. Стандартный образец включен в Реестр фармакопейных стандартных образцов Государственной фармакопеи Российской Федерации с реестровым номером ФСО.3.2.00455⁹ и наименованием «Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (специфическая активность)».

Литература/References

1. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Устинникова ОБ, Саканян ЕИ, Меркулов ВА, Мовсесянц АА и др. Современные проблемы стандартных образцов лекарственных средств в Российской Федерации. *Фармация*. 2020;69(2):5–11. Volkova RA, Fadeikina OV, Ustinnikova OB, Sakanyan EI, Merkulov VA, Movsesyants AA, et al. Current problems with the standard samples of medicines in the Russian Federation. *Pharmacy*. 2020;69(2):5–11 (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-02-01>
2. Гегечкори ВИ, Шатилина АА, Шульга НА, Петухова ЯД, Смирнов ВВ, Раменская ГВ. Биологические стандартные образцы: актуальные вопросы разработки и порядка аттестации. *Эталоны. Стандартные образцы*. 2023;19(3):21–9. Gegchkori VI, Shatilina AA, Shulga NA, Petukhova YaD, Smirnov VV, Ramenskaya GV. Biological reference materials: topical issues of development and certification procedure. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(3):21–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-21-29>
3. Олефир ЮВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ, Саканян ЕИ, Меркулов ВА, Мовсесянц АА, Бондарев ВП. Проблемы стандартных образцов биологических лекарственных средств. В кн.: *Сборник тезисов докладов III международной научной конференции «Стандартные образцы в измерениях и технологиях»*. Екатеринбург; 2018. С. 148–50. Olefir YuV, Volkova RA, Fadeikina OV, Sakanyan EI, Merkulov VA, Movsesyants AA, Bondarev VP. Problems of biological reference standards. In: *Collection of abstracts of the III International Scientific Conference "Reference materials in measurements and technologies"*. Ekaterinburg; 2018. P. 148–50 (In Russ.). EDN: [YSMLQL](https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-21-29)
4. Meager A, Gaines Das R, Zoon K, Mire-Sluis A. Establishment of new and replacement World Health Organization International Biological Standards for human interferon alpha and omega. *J Immunol Methods*. 2001;257(1–2):17–33. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00460-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00460-4)
5. Петров АЮ, Сысуев ЕБ, Новикова НА. Некоторые особенности применения стандартных образцов в фармации. *Роль технического регулирования и стандартизации в эпоху цифровой экономики. Сборник статей II Международной научно-практической конференции молодых ученых*. Екатеринбург: Ажур; 2020. С. 21–32. Petrov AYU, Sysuev EB, Novikova NA. Some features of application standard samples in pharmacy. *The role of technical regulation and standardization in the era of the digital economy. Collection of articles of the II International Scientific and Practical Conference of Young Scientists*. Ekaterinburg: Azhur; 2020. P. 21–32 (In Russ.). EDN: [JGBEAC](https://doi.org/10.1007/s11094-017-1680-6)
6. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50> Fadeikina OV, Volkova RA. Elaboration of certification procedures for reference standards of biological drugs. *Pharm Chem J*. 2017;51(8):716–21. <https://doi.org/10.1007/s11094-017-1680-6>
7. Гайдерова ЛА, Никитина ТН, Фадейкина ОВ, Байкова МЛ, Устинникова ОБ, Климов ВИ, Шведов ДВ. Аттестация отраслевого стандартного образца активности лейкоцитарного интерферона альфа типа. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2014;(2):31–6. Gayderova LA, Nikitina TN, Fadeikina OV, Baikova ML, Ustinnikova OB, Klimov VI, Shvedov DV. Evaluation of branch reference standard of leukocyte interferon alpha activity. *Biopreparation (Biopharmaceuticals)*. 2014;(2):31–6 (In Russ.). EDN: [SJRCDF](https://doi.org/10.1007/s11094-017-1680-6)

⁹ <https://www.regmed.ru/produkt-n-service/fso/fso-registry/fso-of-biological-origin/>

8. Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК, Мотузова ЕВ, Лысикова СЛ, Солдатов АА, Авдеева ЖИ. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(1):13–26.
Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, Motuzova EV, Lysikova SL, Soldatov AA, Avdeeva GI. Assessment of biotechnological products specific activity. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(1):13–26 (In Russ.).
EDN: [YHSSGL](#)
9. Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2012.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Л.А. Гайдерова** – обсуждение результатов, редактирование текста рукописи и утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **Ю.Н. Лебедева** – разработка дизайна и проведение экспериментальных исследований, систематизация, статистическая обработка, оформление и интерпретация результатов; **Т.Н. Лобанова** – анализ результатов, написание, редактирование и переработка текста рукописи; **Э.К. Липатова** – проведение экспериментальных исследований, оформление и систематизация результатов; **Р.А. Волкова** – разработка дизайна исследования, обсуждение программы аттестации и анализ результатов; **О.В. Фадейкина** – обсуждение и статистический анализ результатов; разработка сопроводительных документов (паспортов, этикеток).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **L.A. Gaiderova** discussed the results, edited the manuscript, and approved the final version for publication. **Yu.N. Lebedeva** designed the study; conducted experiments; carried out statistical processing of the results; registered, systematised, and interpreted the results. **T.N. Lobanova** analysed the results, drafted and edited the manuscript. **E.K. Lipatova** conducted experiments, formatted and systematised the results. **R.A. Volkova** designed the study, discussed the certification programme, and analysed the results. **O.V. Fadeikina** carried out statistical analysis of the results, designed the accompanying documentation for the reference standard (certificates, labels).

Об авторах / Authors

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

Лебедева Юлия Николаевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8933-6966>
lebedevaun@expmed.ru

Лобанова Татьяна Николаевна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8972-4851>
Tlobanova@expmed.ru

Липатова Эльвира Константиновна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1471-8737>
lipatova@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

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

Yulia N. Lebedeva
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8933-6966>
lebedevaun@expmed.ru

Tatiana N. Lobanova, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8972-4851>
Tlobanova@expmed.ru

Elvira K. Lipatova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1471-8737>
lipatova@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

Поступила 07.11.2023

После доработки 20.02.2024

Принята к публикации 29.02.2024

Received 7 November 2023

Revised 20 February 2024

Accepted 29 February 2024



Разработка и валидация методики определения остаточного белка А в фармацевтических субстанциях терапевтических моноклональных антител

Е.В. Ноздрина^{1,✉}, Д.А. Мазалев¹, Д.Р. Рогозина¹, С.П. Живодеров², И.В. Лягоскин¹, Р.Р. Шукуров¹

¹ Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», ул. Академика Бакулова, д. 1, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

✉ Ноздрина Елена Васильевна; evnozdrina@generium.ru

РЕЗЮМЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ. При контроле качества препаратов терапевтических моноклональных антител важной задачей является определение остаточного белка А, появление которого связано с вымыванием из носителя в процессе аффинной хроматографической очистки антител. Иммуноферментное определение белка А осложняется эффектом влияния присутствия неродственных соединений (иммуноглобулины) в образце (эффект матрицы), что может приводить к ложноотрицательным результатам анализа. Для повышения эффективности иммуноферментного анализа (ИФА) необходимо разработать этап пробоподготовки образцов, позволяющий необратимо разорвать связь в комплексе «белок А – моноклональное антитело».

ЦЕЛЬ. Разработка и валидация аналитической методики иммуноферментного определения остаточного белка А в фармацевтических субстанциях терапевтических моноклональных антител с использованием набора реагентов для ИФА на основе реактивов собственного производства (in-house).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В качестве антигена использовали рекомбинантный белок А. Нарботку поликлональных антител к белку А проводили путем иммунизации кур с последующим отбором яиц и выделением из них антител. Специфичные к белку А антитела очищали с применением аффинной хроматографии. Остаточный белок А определяли после предварительной пробоподготовки образцов с помощью сэндвич-ИФА. Валидацию методики проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ОФС.1.1.0012).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Нарботаны, выделены и очищены куриные антитела (IgY) против рекомбинантного белка А. Разработаны условия пробоподготовки и методика для проведения иммуноферментного определения остаточного белка А. Подобраны оптимальные составы буферных растворов, в том числе состав денатурирующего буфера для разрушения комплекса «белок А – моноклональное антитело». Проведена валидация разработанной методики. Измеряемые значения белка А при оценке правильности методики находились в пределах 83–108% от номинального, при оценке межлабораторной прецизионности – в пределах 96–116%, при оценке повторяемости – до 13%. Нижний предел количественного определения составил 10 нг/мл при минимально необходимом разведении 1:10. Аналитическая область методики – от 10 до 40 нг/мл. Методика показала сопоставимые результаты по сравнению с аналогичным набором реагентов иностранного производства.

ВЫВОДЫ. Разработанная методика определения остаточного белка А с использованием набора реагентов для иммуноферментного анализа на основе реактивов собственного

производства позволяет минимизировать эффект матрицы в препаратах терапевтических моноклональных антител. Применение методики позволит решить проблему импортозамещения и снизить затраты на контроль качества российских иммунобиологических препаратов.

Ключевые слова: белок А; определение остаточного белка А; терапевтические моноклональные антитела; комплекс «белок А — моноклональное антитело»; куриные иммуноглобулины IgY; аффинная хроматографическая очистка антител; иммуноферментный анализ; валидация методики; эффект матрицы; пробоподготовка образцов

Для цитирования: Ноздрина Е.В., Мазалев Д.А., Рогозина Д.Р., Живодеров С.П., Лягоскин И.В., Шукуров Р.Р. Разработка и валидация методики определения остаточного белка А в фармацевтических субстанциях терапевтических моноклональных антител. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):32–45. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-32-45>

Финансирование. Исследования выполнялись в рамках научно-исследовательской работы АО «ГЕНЕРИУМ».

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

Development and validation of an analytical procedure for the determination of residual protein A in active substances of therapeutic monoclonal antibodies

Elena V. Nozdrina^{1,✉}, Denis A. Mazalev¹, Daria R. Rogozina¹, Sergey P. Zhivoderov², Ivan V. Lyagoskin¹, Rakhim R. Shukurov¹

¹ GENERIUM JSC, 14 Vladimirskaia St., Volginsky, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

² Federal Research Center for Virology and Microbiology, 1 Academician Bakoulov St., Volginsky, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

✉ Elena V. Nozdrina; evnozdrina@generium.ru

ABSTRACT

SCIENTIFIC RELEVANCE. An important quality-control issue for therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) is the determination of residual protein A leaching from the carrier during the purification of mAbs by affinity chromatography. However, unrelated compounds (immunoglobulins) present in the sample can complicate the immunoenzymatic detection of protein A (matrix effect), potentially leading to false-negative test results. To increase the efficiency of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), it is necessary to develop a sample preparation step that can irreversibly break the bond in the protein A–mAb complex.

AIM. This study aimed to develop and validate an analytical procedure for the determination of residual protein A in active substances of therapeutic mAbs by ELISA with a test kit comprising in-house reagents.

MATERIALS AND METHODS. Recombinant protein A was used as an antigen. Polyclonal antibodies to protein A were produced by immunising chickens, selecting immunised eggs, and isolating antibodies from these eggs. Protein A-specific antibodies were purified by affinity chromatography. Residual protein A was determined using sandwich ELISA with preliminary sample preparation. The analytical procedure was validated in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (Validation of Analytical Procedures, OFS.1.1.0012).

RESULTS. The authors obtained, isolated, and purified chicken IgY antibodies to recombinant protein A. The authors selected sample preparation conditions for the determination of residual protein A by ELISA and optimum compositions of buffer solutions, including the composi-

tion of a denaturing buffer to disrupt the protein A–mAb complex. The developed analytical procedure was validated. According to the measurements of protein A, the accuracy of the analytical procedure ranged within 83–108% of the nominal value, the interlaboratory precision ranged within 96–116%, and the repeatability was up to 13%. The lower limit of quantitation was 10 ng/mL with a minimum required dilution of 1:10. The analytical range extended from 10 to 40 ng/mL. The analytical procedure showed results comparable to those obtained with a similar test kit from an international manufacturer.

CONCLUSIONS. The developed analytical procedure for the determination of residual protein A by ELISA with a test kit comprising in-house reagents can minimise the matrix effect in therapeutic mAbs. This analytical procedure will alleviate import substitution and reduce quality control costs for Russian immunobiologicals.

Keywords:

protein A; determination of residual protein A; therapeutic monoclonal antibodies; mAb; protein A–mAb complex; chicken IgY immunoglobulins; purification of antibodies by affinity chromatography; immunoenzyme assay; validation of analytical procedures; matrix effect; sample preparation

For citation:

Nozdrina E.V., Mazalev D.A., Rogozina D.R., Zhivoderov S.P., Lyagoskin I.V., Shukurov R.R. Development and validation of an analytical procedure for the determination of residual protein A in active substances of therapeutic monoclonal antibodies. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):32–45. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-32-45>

Funding. This study was carried out as part of the research work of GENERIUM JSC.

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

Введение

Благодаря способности связывать иммуноглобулины белок А золотистого стафилококка широко применяется в практической биотехнологии и биохимии. В частности, аффинные сорбенты с белком А в качестве лиганда часто используются для выделения терапевтических моноклональных антител в фармацевтическом производстве. Основные преимущества аффинной хроматографии на основе белка А при очистке терапевтических антител — способность специфически связывать антитела и возможность достигать высокой чистоты продукта. Однако недостатком данного метода является эффект вымывания белка А из носителя — часть белка А (лиганд) элюируется с колонки совместно с антителом [1].

Белок А является одним из факторов патогенности *Staphylococcus aureus* за счет способности связываться с Fc-фрагментом иммуноглобулинов, однако кроме этого белок А может вызывать воспалительные реакции, инициируемые взаимодействием с TNF- α , фактором фон Виллебранда и рецептором к C1q-компоненту комплемента (C1qR) [2]. Известно, что производственные примеси, присутствующие после очистки продукта (белки клетки-хозяина, липиды или ДНК клеток-продуцентов, белки контактирующих агентов и др.), могут индуцировать иммунный ответ или, выполняя роль адъювантов, стимулировать иммунные реакции на целевой рекомбинантный белок [3].

Используемый в настоящее время для аффинной хроматографии белок А был модифицирован путем сайт-направленного мутагенеза с целью повышения pH, при котором возможно элюирование антител с аффинного носителя [4]. Однако присутствие остаточного белка А в конечном продукте, тем не менее, возможно, что является нежелательным, в связи с чем должно контролироваться на всех этапах очистки.

Наиболее распространенными методами анализа остаточного белка А являются различные варианты иммуоферментного анализа (ИФА). Основным недостатком ИФА — невозможность обнаружения белка А в низких концентрациях (менее 1 нг/мл), что осложняется эффектом влияния присутствия неродственных соединений в образце (эффект матрицы), искажающим результаты.

На рынке представлены наборы реагентов ИФА различных производителей: Cygnus Technologies (США), GenScript (США), R&D Systems (США) и др. Однако не все наборы реагентов позволяют решить проблему, связанную с влиянием эффекта матрицы. Важным ограничивающим фактором являются трудности, связанные с логистикой иностранных наборов реагентов и их высокой стоимостью. Разработка набора реагентов для ИФА на основе реактивов собственного производства (in-house) может решить проблему импортозамещения и снизить затраты на контроль качества российских иммунобиологических препаратов.

Цель работы — разработка и валидация аналитической методики иммуноферментного определения остаточного белка А в фармацевтических субстанциях терапевтических моноклональных антител с использованием набора реагентов для ИФА на основе реактивов собственного производства (in-house).

Материалы и методы

Материалы

В работе использовали следующие реактивы:

- на стадиях хроматографической очистки, разработки и валидации методики, а также при иммунизации животных использовали рекомбинантный белок А (АО «ГЕНЕРИУМ»);
- полиэтиленгликоль 6000 (Sigma-Aldrich, кат. № 81260);
- для приготовления буферных растворов использовали натрия фосфат 1-замещенный 2-водный (PanReas AppliChem, кат. № 141677.0416), натрия хлорид (AKZO NOBEL Salt A/S, кат. № 11711/01-270421), натрия ацетат 3-водный (PanReas AppliChem, кат. № 131632.1211), натрия гидрофосфат (Sigma-Aldrich, кат. № S9736);
- ИФА проводили с использованием реагентов: натрия гидрокарбонат (Sigma-Aldrich, кат. № S6297), натрия карбонат безводный (Sigma-Aldrich, кат. № S7795), натрия гидроксид (PanReas AppliChem, кат. № 141687), бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, кат. № A7030), фосфатно-солевой буфер pH 7,2–7,6 (ЭКО Сервис, кат. № B-60201), полисорбат 20 (PanReas AppliChem, кат. № 142312), желатин (Sigma-Aldrich, кат. № G1890-100G), трис(гидроксиметил)аминометан (Scharlau, кат. № TR04221000), тритон X-100 (Sigma-Aldrich, кат. № T9284), лимонная кислота безводная (PanReas AppliChem, кат. № 141808.1211), 3-натрия цитрат 2-водный (PanReas AppliChem, кат. № 131655.1211), HEPES (BioFroxx, кат. № 1194KG001), 3,3',5,5' тетраметилбензидин (Биотест Системы, кат. № 01016-1), серная кислота концентрированная (PanReas AppliChem, кат. № 471058), соляная кислота (PanReas AppliChem, кат. № 141020.1611), набор для конъюгирования (Bio-Rad, кат. № LNK004P), рекомбинантный белок L (Thermo Scientific™, кат. № 21189), набор реагентов Mix-N-Go Protein A Assay (Cygus Technologies, США, кат. № F610).

Методы

Иммунизация. Экспериментальные работы проводили на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (ФГБНУ ФИЦВиМ) на курах-несушках

породы Русская (виварий лаборатории молекулярной вирусологии). Протокол исследования на животных был одобрен этическим комитетом ФГБНУ ФИЦВиМ (протокол № 05-23 от 18.07.2023). Выбор экспериментальных животных обусловлен следующими факторами: птичьи иммуноглобулины IgY (функциональный эквивалент IgG млекопитающих) не имеют сайтов связывания белка А; IgY накапливаются в желтках, что позволяет проводить гуманную иммунизацию без тотального отбора крови у животных [5, 6].

Проводили пятикратную иммунизацию с двухнедельным интервалом. В качестве антигена использовали белок А (АО «ГЕНЕРИУМ») в соотношении 1:1 с полным адъювантом Фрейнда (для первого введения) или неполным адъювантом Фрейнда (для следующих введений). Отбор яиц осуществляли с 49 сут и до окончания иммунизации.

Выделение и очистка антител. Куриные антитела выделяли путем осаждения полиэтиленгликолем 6000 по стандартной методике [7]. Осадок антител растворяли буфером, содержащим 15 мМ натрия фосфат, 150 мМ натрия хлорид, pH 7,4 из расчета 5 мл буфера на 1 желток.

Очистку антител проводили с использованием метода аффинной хроматографии с помощью хроматографа AKTA avant 25 (GE HealthCare, Швеция) с применением сорбента с иммобилизованным белком А в качестве лиганда. Хроматографическую колонку Tricorn 10/150 (GE HealthCare, Швеция) объемом 10 мл перед нанесением образца промывали 5 объемами буфера для нанесения (15 мМ натрия фосфат, 150 мМ натрия хлорид, pH 7,4) при скорости потока 380 см/ч. Антитела перед началом хроматографии разбавляли буфером для нанесения в три раза и наносили на колонку со скоростью потока 300 см/ч, после чего колонку промывали 5 объемами буфера для нанесения и кондиционирующего буфера (10 мМ натрия фосфат, 10 мМ натрия ацетат, 50 мМ натрия хлорид, pH 6,5) со скоростью 380 см/ч. Элюцию проводили в присутствии кислого буфера (50 мМ натрия ацетат, 50 мМ натрия хлорид, pH 2,8) при скорости потока 300 см/ч. Момент начала сбора фракции соответствовал значению оптической плотности элюата 20 mAU при длине волны 280 нм; сбор фракции заканчивали (после прохождения максимума на кривой элюции) при снижении значения оптической плотности до 30 mAU. По окончании элюции в целевую фракцию добавляли 0,5 М натрия гидрофосфат до конечной концентрации 50 мМ и 1 М натрия гидроксид до значения pH 7,0.

Иммуноферментный анализ. Методика определения остаточного белка А в присутствии моноклональных антител основана на сэндвич-ИФА с использованием образцов, прошедших предварительную подготовку. В лунки планшета для ИФА вносили куриные антитела к белку А (0,5 мкг/лунка), сорбцию проводили в течение 14–16 ч при 5 °С. На этапе пробоподготовки к образцам и калибровочным растворам добавляли денатурирующий буфер, инкубировали 15 мин при комнатной температуре. После инкубации и центрифугирования образцов 25 мкл супернатанта вносили в лунки планшета с нейтрализующим буфером, инкубировали 1,5 ч при 25 °С. Образовавшийся комплекс «белок А — моноклональное антитело» выявляли с помощью куриных антител к белку А (0,07 мкг/лунку), конъюгированных с пероксидазой хрена; инкубацию проводили в течение 1 ч при 25 °С. Оптическую плотность окрашенного продукта определяли с использованием спектрофотометра xMark (Bio-Rad, США) при длинах волн 450/650 нм.

Результаты измерений обрабатывали автоматически с помощью программного обеспечения Microplate Manager (Bio-Rad, США) путем построения калибровочного графика зависимости среднего значения оптической плотности каждого из калибровочных растворов от десятичного логарифма содержания белка А, применяя 4-параметрическую логистическую функцию.

Приготовление модельных и калибровочных растворов. Калибровочные растворы готовили путем внесения рекомбинантного белка А в буферный раствор для разведения образцов до концентраций 10,00, 5,00, 2,50, 1,25, 0,63, 0,31 и 0,16 нг/мл.

Для разработки методики готовили модельные образцы из 6 различных субстанций моноклональных антител производства АО «ГЕНЕРИУМ» (А, В, С, D, E, F) с добавлением 100 нг/мл белка А в каждую. Все модельные образцы и субстанции (без внесения белка А) исследовали в разведениях 1:40, 1:80, 1:160, 1:320.

Для проведения валидации методики (оценка правильности и прецизионности) готовили модельные образцы субстанции Е. В субстанцию вносили рекомбинантный белок А до концентрации 10, 16, 20, 24, 40 нг/мл. Для оценки специфичности в буфер готовой лекарственной формы моноклонального антитела на основе субстанции Е добавляли 10 нг/мл, в субстанцию Е — 50 нг/мл рекомбинантного белка А

(иммуноглобулин-связывающий белок, используемый для выделения моноклональных антител наряду с белком А).

Перед проведением валидационных испытаний полученные модельные образцы разводили в 10, 20, 40 и 80 раз буфером для разведения.

Статистическая обработка результатов. Для оценки результатов валидации использовали статистические методы анализа с вычислением коэффициента вариации (coefficient of variation, CV, %) и степени извлечения (recovery, R, %). Коэффициент вариации рассчитывали как отношение стандартного отклонения (relative standard deviation, RSD) к среднему значению экспериментально установленной концентрации белка А (найденное значение), выраженное в процентах. Степень извлечения рассчитывали как отношение найденного значения к истинному значению концентрации белка А, внесенному в модельный образец (номинальное значение), выраженное в процентах¹. Все расчеты проводили в программе Microsoft Office Excel 2016.

Результаты и обсуждение

Разработка методики определения остаточного белка А

На первом этапе разработки методики необходимым условием был подбор оптимальных составов буферных растворов для проведения ИФА. Для получения корректных результатов перед проведением анализа необходимо обеспечить разрыв связи в комплексе «белок А — моноклональное антитело» и не допустить повторного образования комплекса (рис. 1) [8]. Подбор условий диссоциации осложняется природой образования комплекса, так как белок А может реагировать с Fc-фрагментом большинства IgG, Fab-фрагментом антител, содержащих V_HIII домен, и паратопом специфичных антител [9].

В ходе исследования взаимодействия белка А и IgG1 было показано, что при pH 3,0 разрушаются электростатические взаимодействия молекулы белка А и иммуноглобулина и молекулы диссоциируют [10]. Таким образом, на этапе пробоподготовки pH испытуемых образцов необходимо поддерживать на уровне не выше 3,0. Однако куриные иммуноглобулины IgY активны в диапазоне pH от 3,5 до 11,0 [6], следовательно, перед нанесением на планшет для ИФА подкисленные образцы должны пройти нейтрализацию. Нейтрализация образцов, в свою очередь, может привести к повторному

¹ Bioanalytical method validation. Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine; 2018.

образованию комплекса «белок А — моноклональное антитело» и снижению чувствительности из-за эффекта матрицы [11]. Для решения этой проблемы необходимо было денатурировать моноклональные антитела таким образом, чтобы они не могли повторно взаимодействовать с белком А (рис. 2).

Были подобраны оптимальные составы буферного раствора для разведения образцов, денатурирующего и нейтрализующего буферных растворов, которые образуют единую систему, позволяющую с достаточной правильностью определять аналит (табл. 1). Значения pH всех буферных растворов подобраны таким образом, что при добавлении в буфер для разведения денатурирующего буфера обеспечивается значение pH, равное 3,0, а при внесении подготовленных образцов в нейтрализующий буфер значение pH не сдвигается в сторону кислых значений.

С применением описанных буферных растворов был проведен ИФА. В качестве образцов были использованы субстанции шести различных моноклональных антител, относящихся к подклассам IgG1 (субстанции А, С, D и Е), IgG2 (субстанция В), IgG4 (субстанция F), а также модельные образцы с внесением 100 нг/мл белка А в каждый образец субстанции. Результаты

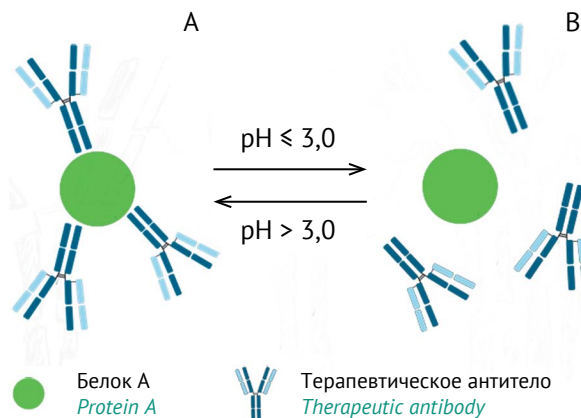


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Схематичное изображение комплекса «белок А — моноклональное антитело» и его диссоциации. А — при pH выше 3,0 антитело и белок А существуют в виде комплекса; В — при pH ниже 3,0 все связи в комплексе разрушаются, антитело и белок А диссоциируют.

Fig. 1. Schematic image of the protein A–monoclonal antibody complex and its dissociation. A, the antibody and protein A exist as a complex at a pH above 3.0; B, all bonds in the complex are destroyed, and the antibody and protein A are dissociated at a pH below 3.0.

проведенных экспериментов показали эффективность денатурации и правильность методики: степень извлечения для модельных образцов

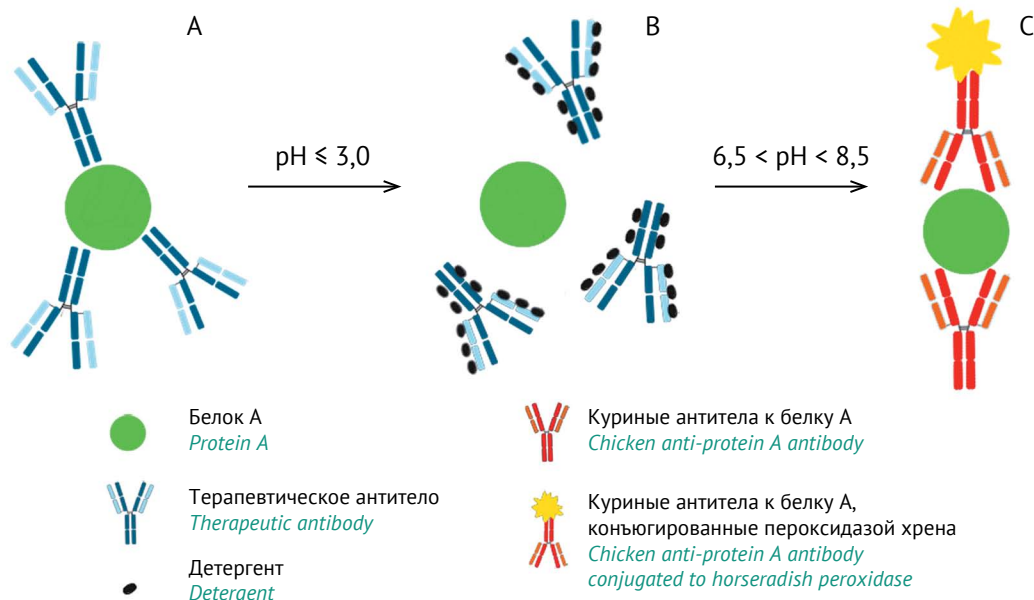


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Схематичное представление разработанной методики определения остаточного белка А. А — комплекс «белок А — моноклональное антитело»; В — комплекс диссоциирует при pH не выше 3,0, детергент блокирует повторное связывание терапевтического антитела с белком А; С — свободный белок А вступает в реакцию иммуноферментного анализа при значениях pH от 6,5 до 8,5.

Fig. 2. Schematic representation of the developed analytical procedure for the determination of residual protein A. A, a protein A–monoclonal antibody complex; B, the protein A–monoclonal antibody complex dissociates at a pH no higher than 3.0, and the detergent blocks the re-binding of the therapeutic antibody to protein A; C, free protein A reacts in the enzyme immunoassay at a pH of 6.5 to 8.5.

Таблица 1. Описание буферных растворов
Table 1. Description of buffer solutions

Наименование Name	Описание* Description*
Буферный раствор для разведения образцов Sample dilution buffer	Трис-содержащий буферный раствор с протектором, защищающим белок А от денатурации Tris-containing buffer solution with a protector that shields protein A from denaturation
Денатурирующий буферный раствор Denaturing buffer	Цитратный буфер, поддерживающий оптимальное значение pH для реакции, содержащий детергенты, обеспечивающие необратимую денатурацию иммуноглобулинов Citrate buffer that maintains the optimum pH value for the reaction, containing detergents that ensure irreversible denaturation of immunoglobulins
Нейтрализующий буферный раствор Neutralising buffer	0,1 М HEPES

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

Примечание. * – состав буферных растворов оформлен в виде заявки на получение ноу-хау АО «ГЕНЕРИУМ» №534.
Note. *, the authors filed a know-how request for the composition of buffer solutions (know-how No. 534 of GENERIUM JSC).

не выходила за пределы 20% отклонения от номинального значения (рис. 3). При этом эффективность ИФА не зависела от подкласса IgG. Содержание белка А в субстанциях без внесения белка А было ниже предела чувствительности методики, поэтому было приравнено к нулю (данные не представлены).

Валидация методики определения остаточного белка А

Валидацию методики проводили с использованием субстанции Е в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XV изд. (ГФ РФ XV)² и Решения

Коллегии Евразийской экономической комиссии № 113³. Согласно указанным документам аналитическая методика количественного определения примесей должна быть оценена по следующим валидационным характеристикам: правильность (ассигура), повторяемость (repeatability), промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность (intermediate (intra-laboratory) precision), селективность (selectivity), специфичность (specificity), нижний предел количественного определения (lower limit of quantification), линейность (linearity), диапазон применения (аналитическая область) (range). Кроме перечисленных критериев также были

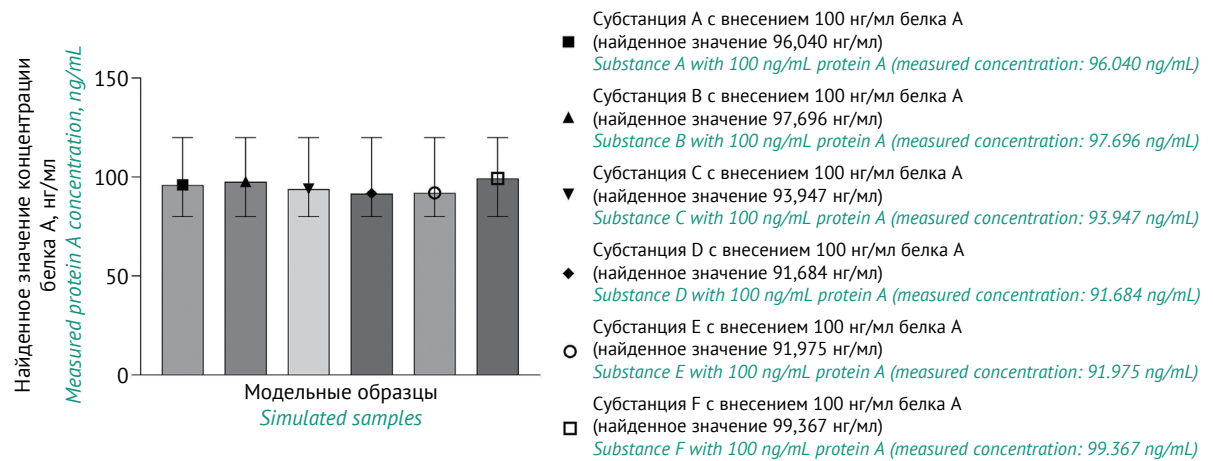


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Определение содержания белка А в модельных образцах методом иммуноферментного анализа. Данные представлены в виде найденного значения содержания белка А в каждом модельном образце и допустимой ошибки анализа (100±20%). В легенде представлено описание модельных образцов.

Fig. 3. Results of measuring protein A in simulated samples using enzyme immunoassay. The data are presented as the measured protein A concentration in each simulated sample and the acceptable analysis error (100±20%). The legend lists the simulated samples.

² ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1; 2023.
³ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии № 113 от 17.07.2018 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств».

оценены минимально необходимое разведение (minimum required dilution) и межлабораторная прецизионность (inter-laboratory precision).

Оценка правильности между аналитическими циклами и внутрилабораторной прецизионности.

Правильность между аналитическими циклами и внутрилабораторная прецизионность оценивались совместно в шести независимых опытах (табл. 2). Пять модельных образцов, содержащих от 10 до 40 нг/мл белка А, и субстанцию без внесения белка А испытывали в четырех разведениях в двух повторностях каждое (раздел «Материалы и методы», подраздел «Приготовление модельных и калибровочных растворов»). В испытаниях участвовали два аналитика, каждый из которых не проводил более одного опыта для оценки правильности в один день. После расчета среднего значения (по шести опытам) для каждого образца определяли степень извлечения (R , %) и коэффициент вариации и оценивали их приемлемость по критериям:

- для образцов с концентрацией белка А 10 нг/мл значение R должно быть в пределах 75–125%, для остальных образцов – 80–120%;
- для образцов с концентрацией белка А 10 нг/мл значение CV не должно превышать 25%, для остальных образцов – 20%.

Значения R и CV в каждом опыте удовлетворяли установленным критериям, что подтвердило правильность и прецизионность методики между аналитическими циклами.

Оценка правильности и прецизионности внутри аналитического цикла. Правильность внутри аналитического цикла и прецизионность (повторяемость) оценивались совместно в пяти независимых опытах (табл. 3). В каждом опыте анализировали шесть независимых повторностей одного из шести модельных образцов в четырех разведениях в двух повторностях каждое (раздел «Материалы и методы», подраздел «Приготовление модельных и калибровочных растворов»). После расчета среднего значения (по шести повторностям) каждого образца определяли R и CV и оценивали их приемлемость по критериям аналогично оценке правильности между циклами и повторяемости.

Полученные значения R и CV для каждого модельного образца удовлетворяли установленным критериям приемлемости. Таким образом, правильность и прецизионность методики внутри аналитического цикла были подтверждены.

Оценка специфичности и селективности. Методика должна однозначно оценивать содержание определяемого вещества в присутствии сопутствующих компонентов. Поэтому селективность и специфичность методики определения

остаточного белка А оценивались путем измерения содержания белка А в трех модельных образцах:

- 1) буфер готовой лекарственной формы моноклонального антитела на основе субстанции Е;
- 2) буфер готовой лекарственной формы, содержащий 10 нг/мл белка А;
- 3) субстанция Е, содержащая 50 нг/мл белка L.

Оптическая плотность в разведениях модельного образца 1 не превышала оптическую плотность буферного раствора для разведения образцов без белка А, поэтому содержание анализируемого вещества приравнивалось к 0 (табл. 4). В модельном образце 2 содержание белка А определялось с необходимой правильностью: R в пределах 80–120%. Полученные результаты подтверждают отсутствие перекрестной реакции с компонентами раствора.

Отсутствие реакции с белком L в разведениях модельного образца 3 указывает на специфичность используемых в анализе антител к белку А и отсутствие перекрестной реакции с другим белком, способным связывать иммуноглобулины.

Оценка нижнего предела количественного определения и минимально необходимого разведения. Нижний предел количественного определения (НПКО) субстанции напрямую зависит от минимально необходимого разведения. Валидируемая методика имеет ограничения, связанные с содержанием моноклональных антител в растворе. Если концентрация антител в образце превышает 2 мг/мл, то наблюдается эффект матрицы, что приводит к ложноотрицательным результатам анализа. Таким образом, субстанция Е, содержащая 20 мг/мл белка, должна быть разведена не менее чем в 10 раз. Каждый проведенный эксперимент подтвердил, что образцы субстанции Е, содержащие белок А в диапазоне 10–40 нг/мл, в разведении 1:10 определялись с требуемой правильностью.

В качестве НПКО выбрано значение 10 нг/мл белка А, так как оптическая плотность двух последовательных разведений такого образца (1:10 и 1:20) превосходила оптическую плотность наименьшего калибровочного раствора, а содержание белка А определялось с требуемой правильностью.

Оценка линейности и аналитической области. Линейность и аналитическая область оценивались совместно с правильностью между аналитическими циклами. Регрессионная зависимость среднего значения найденной в модельных образцах концентрации белка А от фактически

Таблица 2. Результаты оценки правильности между опытами и внутрилабораторной прецизионности методики определения остаточного белка А
Table 2. Results of assessing the between-run accuracy and intermediate precision of the analytical procedure for the determination of residual protein A

Номинальное значение концентрации белка А, нг/мл <i>Nominal concentration of protein A, ng/mL</i>	Номер опыта <i>Experiment number</i>	Найденное значение концентрации белка А, нг/мл <i>Measured protein A concentration, ng/mL</i>	Среднее значение ± RSD, нг/мл <i>Mean ± RSD, ng/mL</i>	R, %	CV, %
0	1	0	0	–	–
	2	0			
	3	0			
	4	0			
	5	0			
	6	0			
10	1	9,169	9,738±0,770	97	8
	2	10,278			
	3	10,206			
	4	8,429			
	5	10,028			
	6	10,315			
16	1	15,023	16,312±1,112	102	7
	2	14,883			
	3	16,719			
	4	17,018			
	5	17,630			
	6	16,597			
20	1	18,649	19,485±0,747	97	4
	2	19,392			
	3	18,796			
	4	19,495			
	5	20,687			
	6	19,892			
24	1	23,144	23,430±0,919	98	4
	2	23,468			
	3	22,562			
	4	22,426			
	5	24,230			
	6	24,747			
40	1	41,133	39,182±2,106	98	5
	2	37,376			
	3	35,872			
	4	40,763			
	5	39,533			
	6	40,416			

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

Примечание. R – степень извлечения; CV – коэффициент вариации; RSD – относительное стандартное отклонение; «–» не применимо.
Note. R, recovery; CV, coefficient of variation; RSD, relative standard deviation; –, not applicable.

Таблица 3. Результаты оценки правильности и прецизионности внутри аналитического цикла методики определения остаточного белка А
Table 3. Results of assessing the within-run accuracy and precision of the analytical procedure for the determination of residual protein A

Номинальное значение концентрации белка А, нг/мл <i>Nominal concentration of protein A, ng/mL</i>	Номер повторности <i>Replicate number</i>	Найденное значение концентрации белка А, нг/мл <i>Measured protein A concentration, ng/mL</i>	Среднее значение ± RSD, нг/мл <i>Mean ± RSD, ng/mL</i>	R, %	CV, %
0	1	0	0	–	–
	2	0			
	3	0			
	4	0			
	5	0			
	6	0			
10	1	8,876	8,303±0,608	83	11
	2	8,656			
	3	8,812			
	4	7,721			
	5	8,339			
	6	7,411			
16	1	13,616	13,854±0,496	87	5
	2	14,578			
	3	13,114			
	4	13,923			
	5	13,746			
	6	14,147			
20	1	19,815	18,616±0,838	93	7
	2	17,863			
	3	18,464			
	4	18,168			
	5	17,896			
	6	19,488			
24	1	27,918	25,934±1,550	108	13
	2	27,726			
	3	25,506			
	4	25,573			
	5	24,666			
	6	24,217			
40	1	38,107	38,962±1,296	97	4
	2	41,535			
	3	38,234			
	4	38,930			
	5	38,326			
	6	38,638			

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

Примечание. R – степень извлечения; CV – коэффициент вариации; RSD – относительное стандартное отклонение; «–» не применимо.
Note. R, recovery; CV, coefficient of variation; RSD, relative standard deviation; –, not applicable.

Таблица 4. Результаты оценки специфичности методики определения остаточного белка А
Table 4. Results of assessing the specificity of the analytical procedure for the determination of residual protein A

Параметр <i>Parameter</i>	Модельный образец <i>Simulated sample</i>		
	Буфер готовой лекарственной формы <i>Formulation buffer</i>	Буфер готовой лекарственной фор- мы, содержащий 10 нг/мл белка А <i>Formulation buffer containing 10 ng/mL protein A</i>	Субстанция Е, содержа- щая 50 нг/мл белка А <i>Substance E containing 50 ng/mL protein A</i>
Найденное значение концентрации белка А, нг/мл <i>Measured protein A concentration, ng/mL</i>	0	10,209	0
R, %	–	102	–

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

Примечание. R – степень извлечения; «–» – не применимо.
Note. R, recovery; –, not applicable.

внесенной концентрации имеет линейный ха-
рактер (рис. 4).
Коэффициент корреляции (R^2) полученной
линейной функции составил 0,9985, $k=0,9242$,
что соответствует заданным критериям при-
емлемости ($R^2 \geq 0,99$; $0,8 \leq k \leq 1,2$). Аналитическая
область была определена как интервал концен-
трации остаточного белка А от 10 до 40 нг/мл,
что представляет собой диапазон 50–200% от до-
пустимого содержания белка А в субстанции Е
(20 нг/мл).

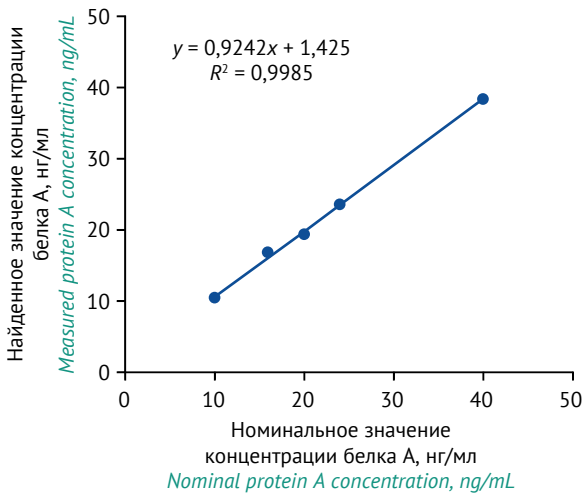


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Оценка линейности методики определения оста-
точного белка А. Данные представлены в виде регрессион-
ной зависимости среднего значения найденной в модель-
ных образцах концентрации белка А от их номинального
значения. На графике приведены уравнение полученной
линейной функции и коэффициент вариации.

Fig. 4. Results of assessing the linearity of the analytical proce-
dure for the determination of residual protein A. The data are
presented as a regression of the mean protein A concentration
measured in simulated samples versus the nominal concen-
tration. The graph shows the equation of the resulting linear
function and the coefficient of variation.

Оценка межлабораторной прецизионности.
Межлабораторную прецизионность оценивали
как отношение среднего значения найденной
в модельных образцах концентрации белка А
аналитиками второй лаборатории к среднему
значению найденной в модельных образцах
концентрации белка А аналитиками первой
лаборатории (R, %). Полученные результаты
(табл. 5) оценивались согласно критерию при-
емлемости: отношение должно находиться в ин-
тервале от 80 до 120% (для модельного образца
10 нг/мл – от 75 до 125 %).
Результаты оценки межлабораторной преци-
зионности удовлетворяли заданным критериям.
Таким образом, воспроизводимость методики
была подтверждена.

Сравнение разработанной методики
с использованием набора реагентов для ИФА
на основе реактивов собственного производства
(in-house) с коммерческим набором реагентов

Так как разработанная методика соответ-
ствовала всем валидационным критериям,
на следующем этапе работы была рассмотрена
ее пригодность в качестве альтернативы ком-
мерческому набору реагентов Mix-N-Go Protein
A Assay.
Проводили параллельное измерение со-
держания белка А в двух субстанциях (D и E)
и их полупродуктах (промежуточные продукты
процесса хроматографической очистки), по-
лученных на производстве, с использованием
набора реагентов для ИФА на основе реак-
тивов собственного производства (in-house)
и коммерческого набора реагентов Mix-N-Go
Protein A Assay (табл. 6). Определение содер-
жания белка А в полупродуктах необходимо
в рамках характеристики и валидации процес-
са очистки. Результаты, полученные с помощью
набора реагентов для ИФА на основе реактивов

Таблица 5. Результаты оценки межлабораторной прецизионности методики определения остаточного белка А
Table 5. Results of assessing the inter-laboratory precision of the analytical procedure for the determination of residual protein A

Номинальное значение концентрации белка А, нг/мл <i>Nominal concentration of protein A, ng/mL</i>	Среднее найденное значение концентрации белка А, установленное аналитиками в лаборатории, нг/мл <i>Mean concentration of protein A, ng/mL, measured by analysts in</i>		R, %
	Лаборатория № 1 <i>Laboratory 1</i>	Лаборатория № 2 <i>Laboratory 2</i>	
0	0	0	–
10	9,738	11,261	116
16	16,312	17,359	106
20	19,485	19,351	99
24	23,430	23,768	101
40	39,182	37,687	96

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

Примечание. R – степень извлечения; «–» – не применимо.
Note. R, recovery; –, not applicable.

Таблица 6. Сравнение разработанной методики определения остаточного белка А с коммерческим набором реагентов
Table 6. Comparison of the developed analytical procedure for the determination of residual protein A with a commercial test kit

Испытуемый образец <i>Test sample</i>	Найденное значение концентрации белка А, нг/мл <i>Measured protein A concentration, ng/mL</i>		R, %	CV, %
	Набор реагентов Mix-N-Go Protein A Assay <i>Mix-N-Go Protein A Assay Kit</i>	Набор реагентов для ИФА на основе реактивов собственного производства (in-house) <i>In-house ELISA test kit</i>		
Полупродукт субстанции D № 1 <i>Intermediate substance D1</i>	88,873	108,951	82	14
Полупродукт субстанции D № 2 <i>Intermediate substance D2</i>	69,588	76,810	91	7
Полупродукт субстанции D № 3 <i>Intermediate substance D3</i>	25,676	23,633	109	6
Полупродукт субстанции D № 4 <i>Intermediate substance D4</i>	0	0	–	–
Субстанция D <i>Substance D</i>	7,923	7,989	99	1
Полупродукт субстанции E № 1 <i>Intermediate substance E1</i>	46,639	52,061	89	8
Полупродукт субстанции E № 2 <i>Intermediate substance E2</i>	0	0	–	–
Полупродукт субстанции E № 3 <i>Intermediate substance E3</i>	0	0	–	–
Субстанция E <i>Substance E</i>	0	0	–	–

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

Примечание. R – степень извлечения; CV – коэффициент вариации; «–» не применимо.
Note. R, recovery; CV, coefficient of variation; –, not applicable.

собственного производства, находились в пределах 80–120% от значений, полученных с применением коммерческого набора, что указывает на сопоставимость полученных данных и возможность применения разработанной методики для определения содержания белка А не только в субстанции, но и в ее полупродуктах.

Выводы

1. Разработана методика определения остаточного белка А в фармацевтических субстанциях терапевтических моноклональных антител с использованием набора реагентов для иммуноферментного анализа на основе реактивов собственного производства (in-house). Подобран

состав буферных растворов для проведения анализа (буфер для разведения образцов, денатурирующий и нейтрализующий буферы), что позволило решить проблему эффекта матрицы.

2. Проведена валидация методики определения остаточного белка А. Установлено, что методика соответствует всем валидационным параметрам: полученные значения при оценке правильности методики находились в пределах 83–108% от номинального, при оценке межлабораторной прецизионности — в пределах 96–116%, при оценке повторяемости — до 13%. Нижний предел количественного определения составил 10 нг/мл, минимально

необходимое разведение — 1:10, аналитическая область — 10–40 нг/мл.

3. Результаты, полученные с помощью набора реагентов для иммуноферментного анализа с реактивами собственного производства (in-house), сопоставимы с данными, получаемыми при использовании коммерческого набора реагентов иностранного производства. Применение разработанной методики определения остаточного белка А и набора реагентов с реактивами собственного производства позволит решить проблему импортозамещения и снизить затраты на контроль качества российских иммунобиологических препаратов.

Литература/References

1. Sanchez-Trasvina C, Flores-Gatica M, Enriquez-Ochoa D, Rito-Palomares M, Mayolo-Deloya K. Purification of modified therapeutic proteins available on the market: an analysis of chromatography-based strategies. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:717326. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.717326>
2. Mazigi O, Schofield P, Langley DB, Christ D. Protein A superantigen: structure, engineering and molecular basis of antibody recognition. *Protein Eng Des Sel*. 2019;32(8):359–66. <https://doi.org/10.1093/protein/gzz026>
3. Wilson LJ, Lewis W, Kucia-Tran R, Bracewell DG. Identification and classification of host cell proteins during biopharmaceutical process development. *Biotechnol Prog*. 2022;38(1):e3224. <https://doi.org/10.1002/btpr.3224>
4. Choe W, Durgannavar TA, Chung SJ. Fc-binding ligands of immunoglobulin G: an overview of high affinity proteins and peptides. *Materials (Basel)*. 2016;9(12):994. <https://doi.org/10.3390/ma9120994>
5. Kovacs-Nolan J, Mine Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2012;3:163–82. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101137>
6. Pereira EPV, van Tilburg MF, Florean EOPT, Guedes MIF. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: a review. *Int Immunopharmacol*. 2019;73:293–303. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>
7. Amro WA, Al-Qaisi W, Al-Razem F. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *J Genet Eng Biotechnol*. 2018;16(1):99–103. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.003>
8. Steindl F, Armbruster C, Hahn R, Armbruster C, Katinger HWD. A simple method to quantify staphylococcal protein A in the presence of human or animal IgG in various samples. *J Immunol Methods*. 2000;235(1–2):61–9. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00211-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00211-2)
9. Cruz AR, den Boer MA, Strasser J, Zwarthoff SA, Beurskens FJ, de Haas CJC, et al. Staphylococcal protein A inhibits complement activation by interfering with IgG hexamer formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021;118(7):e2016772118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016772118>
10. Liu FF, Huang B, Dong X-Y, Sun Y. Molecular basis for the dissociation dynamics of protein A-immunoglobulin G1 complex. *PLoS One*. 2013;8(6):e66935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066935>
11. Ren D, Darlucio MR, Chou JH. Development of a multi-product leached protein A assay for bioprocess samples containing recombinant human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*. 2011;366(1–2):20–7. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.02.003>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Ноздрина** — выполнение экспериментальных работ (разработка методики, приготовление модельных образцов, проведение валидационных испытаний, интерпретация результатов исследования, оценка всех валидационных характеристик методики), написание текста рукописи; **Д.А. Мазалев** — выделение и хроматографическая очистка антител, редактирование текста рукописи; **Д.Р. Рогозина** — выполнение экспериментальных работ (приготовление модельных образцов, проведение валидационных испытаний); **С.П. Живодеров** — проведение иммунизации животных; **И.В. Лягоскин** — разработка концепции исследования, критический пересмотр содержания рукописи; **Р.Р. Шукуров** — 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. **E.V. Nozdrina** conducted experiments (developed the analytical procedure, prepared simulated samples, validated the procedure, interpreted the study results (assessed all validation characteristics of the procedure), and drafted the manuscript. **D.A. Mazalev** performed isolation and chromatographic purification of antibodies and edited the manuscript. **D.R. Rogozina** conducted experiments (prepared simulated samples and validated the procedure). **S.P. Zhivoderov** immunised animals. **I.V. Lyagoskin** conceptualised the study, critically reviewed the manuscript. **R.R. Shukurov** approved the final version of the manuscript for publication.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования с использованием экспериментальных животных был одобрен этическим комитетом ФГБНУ ФИЦВиМ (протокол № 05-23 от 18.07.2023).

Благодарности. Авторы выражают благодарность начальнику лаборатории хроматографических методов И.П. Фабричному за активное участие в разработке методики.

Ethics approval. The animal study protocol was approved by the ethics committee at the Federal Research Center for Virology and Microbiology (Protocol No. 05-23 dated 18 July 2023).

Acknowledgements. The authors are grateful to I.P. Fabrichny, Head of the laboratory of chromatographic methods, for active participation in the development of the analytical procedure.

Об авторах / Authors

Ноздрина Елена Васильевна

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-2832-0361>
evnozdrina@ibcgenerium.ru

Мазалев Денис Алексеевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9952-8184>
mazalev@ibcgenerium.ru

Рогозина Дарья Романовна

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-6050-975X>
drrogozina@generium.ru

Живодеров Сергей Петрович, канд. вет. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4919-3080>
szhivodyorov@vniivvim.ru

Лягоскин Иван Владимирович, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9058-1106>
lyagoskin@ibcgenerium.ru

Шукуров Рахим Рахманкулович, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>
Shukurov@ibcgenerium.ru

Elena V. Nozdrina

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-2832-0361>
evnozdrina@ibcgenerium.ru

Denis A. Mazalev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9952-8184>
mazalev@ibcgenerium.ru

Daria R. Rogozina

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-6050-975X>
drrogozina@generium.ru

Sergey P. Zhivoderov, Cand. Sci. (Vet.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4919-3080>
szhivodyorov@vniivvim.ru

Ivan V. Lyagoskin, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9058-1106>
lyagoskin@ibcgenerium.ru

Rakhim R. Shukurov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>
Shukurov@ibcgenerium.ru

Поступила 11.01.2024

После доработки 16.02.2024

Принята к публикации 29.02.2024

Received 11 January 2024

Revised 16 February 2024

Accepted 29 February 2024



Количественная масс-спектрометрия с меткой ^{18}O как альтернативный подход к определению активности протеаз на примере трипсина

М.А. Константинов^{1,✉}, Д.Д. Жданов¹, И.Ю. Торопыгин^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, Москва, 119121, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина» Российской академии наук, пос. Борок, д. 109, Некоузский район, Ярославская область, 152742, Российская Федерация

✉ Константинов Михаил Александрович; mishanyamihail@ya.ru

РЕЗЮМЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ. При контроле качества протеолитических ферментов, входящих в состав лекарственных препаратов, активность протеаз определяется спектрофотометрически, измерением амидазной или эстеразной активности с синтетическим субстратом, и протеолитической по методу Ансона. Данные методы требуют специальных субстратов, обладают низкой чувствительностью, а их специфичность может оказаться недостаточной и приводить к серьезным ошибкам. Альтернативный подход определения активности протеаз реализуется путем количественного масс-спектрометрического измерения, которое обеспечивается добавлением к продуктам гидролиза испытуемого фермента пептида с изотопной меткой. Такой подход позволяет определять протеолитическую активность, причем по гидролизу конкретных пептидных связей, одновременно с подтверждением подлинности и специфичности испытуемого образца с высокой чувствительностью и без использования специальных субстратов.

ЦЕЛЬ. На примере трипсина и казеина исследовать возможность определения активности фермента методом количественной масс-спектрометрии с меткой ^{18}O одновременно с подтверждением подлинности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Использовали трипсин, казеин, H_2^{18}O (НПО «Изотоп», Россия). Разделение пептидов проводили с помощью системы ВЭЖХ Agilent 1100, масс-спектры получали с использованием масс-спектрометра MALDI-TOF/TOF Bruker Ultraflex II. Количественный масс-спектрометрический анализ проводили, применяя пептид сравнения. Пептид получали путем гидролиза казеина трипсином с последующей очисткой с помощью ВЭЖХ. Для получения пептида с изотопной меткой ^{18}O исходный пептид высушивали и инкубировали в воде H_2^{18}O . Количественное определение продукта проводили с применением масс-спектрометрии MALDI-TOF. Для определения активности фермента и расчета константы Михаэлиса (K_m) использовали метод количественной масс-спектрометрии с меткой ^{18}O .

РЕЗУЛЬТАТЫ. При гидролизе казеина трипсином идентифицированы фрагменты, соответствующие цепям этого белка. Получен изотопно-меченый стандарт, концентрация которого была рассчитана масс-спектрометрически. Определена скорость гидролиза казеина трипсином и рассчитана K_m для трипсина, которая составила $13,65 \pm 0,60$ мкМ. Стандартное отклонение значений повторных измерений показало, что ошибка измерений оказалась меньше по сравнению со спектрофотометрическим методом, а минимальная установленная чувствительность предложенного метода составила $0,50 \pm 0,08$ мкМ.

ВЫВОДЫ. Подтверждена возможность применения метода количественного масс-спектрометрического анализа с меткой ^{18}O для определения активности ферментов на примере

трипсина. Установленная чувствительность позволяет оценивать активность фермента одновременно с определением его подлинности и специфичности. Предложенный подход является универсальным, не требует дорогостоящих материалов и реактивов, а также может быть легко адаптирован для определения активности практически любой протеазы.

Ключевые слова: активность фермента; контроль качества препаратов ферментов; протеаза; протеолитическая активность; трипсин; казеин; масс-спектрометрия; ВЭЖХ; количественная протеомика; изотопная метка; ^{18}O

Для цитирования: Константинов М.А., Жданов Д.Д., Торопыгин И.Ю. Количественная масс-спектрометрия с меткой ^{18}O как альтернативный подход к определению активности протеаз на примере трипсина. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):46–60. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-46-60>

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100168-2) с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека».

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

Quantitative mass spectrometry with ^{18}O labelling as an alternative approach for determining protease activity: an example of trypsin

Mikhail A. Konstantinov^{1,✉}, Dmitry D. Zhdanov¹, Ilya Yu. Toropygin^{1,2}

¹ Institute of Biomedical Chemistry, 10/8 Pogodinskaya St., Moscow 119121, Russian Federation

² Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences, 109 Borok, Nekouzsky District, Yaroslavl Region 152742, Russian Federation

✉ Mikhail A. Konstantinov; mishanyamihail@ya.ru

ABSTRACT

SCIENTIFIC RELEVANCE. In the quality control of proteolytic enzyme components of medicinal products, the activity of proteases is determined by spectrophotometry, which involves measuring the amidase or esterase activity using a synthetic substrate and the proteolytic activity using the Anson method. These methods require special substrates and have low sensitivity; their specificity may be insufficient, which may lead to serious errors. Quantitative mass spectrometry is an alternative approach to protease activity assays, which involves adding an isotope-labelled peptide to hydrolysates of the test enzyme. This approach allows determining the activity of proteases, notably, by the hydrolysis of specific peptide bonds, while simultaneously confirming the identity and specificity of the test sample. Quantitative mass spectrometry has high sensitivity and does not require special substrates.

AIM. This study aimed to investigate the possibility of enzymatic activity assay and enzyme identification by quantitative mass spectrometry with ^{18}O labelling through an example of trypsin with casein.

MATERIALS AND METHODS. The study used trypsin, casein, and H_2^{18}O (Izotop, Russia). Peptide separation was performed using an Agilent 1100 HPLC system; mass spectra were obtained using a Bruker Ultraflex II MALDI-TOF/TOF mass spectrometer. Quantitative mass spectrometry was performed using a standard peptide, which was obtained from casein by tryptic digestion and HPLC purification. For ^{18}O labelling, the authors dried the peptide and incubated it in H_2^{18}O water. The quantitative analysis of the product was carried out using MALDI-TOF mass spectrometry. The authors used quantitative mass spectrometry with ^{18}O labelling to determine enzymatic activity and calculate the Michaelis constant (K_M).

RESULTS. Following the tryptic digestion of casein, the authors identified the fragments corresponding to casein chains. The authors produced the isotope-labelled standard peptide and cal-

culated its concentration using mass spectrometry. The authors determined the rate of casein digestion by trypsin and calculated the K_M for trypsin, which was $13.65 \pm 0.60 \mu\text{M}$. The standard deviation for repeated measurements showed that the mass-spectrometric method had a lower error of measurement than the spectrophotometric method. The sensitivity threshold for the mass-spectrometric method was $0.50 \pm 0.08 \mu\text{M}$.

CONCLUSIONS. The results obtained with trypsin confirm the possibility of enzymatic activity determination by the proposed method of quantitative mass spectrometry with ^{18}O labelling. According to the sensitivity evaluation results, this method can be used for the simultaneous determination of enzyme activity, identity, and specificity. The proposed mass spectrometry approach is universal, it does not require expensive materials and reagents, and it can be easily adapted to determine the activity of virtually any protease.

Keywords:

enzyme activity; quality control of enzyme products; protease; proteolytic activity; trypsin; casein; mass spectrometry; HPLC; quantitative proteomics; isotopic labelling; ^{18}O

For citation:

Konstantinov M.A., Zhdanov D.D., Toropygin I.Yu. Quantitative mass spectrometry with ^{18}O labelling as an alternative approach for determining protease activity: an example of trypsin. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):46–60. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-46-60>

Funding. The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100168-2) using "Human Proteome" Core Facility.

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

Введение

К настоящему времени сформировалась достаточно широкая номенклатура лекарственных препаратов белковой природы, полученных как из природных источников (органы и ткани человека и животных), так и биотехнологическими методами (рекомбинантные белки и их производные). В их числе моноклональные антитела, гормоны, цитокины, интерлейкины, интерфероны (ИФН- α , ИФН- β , ИФН- γ), ингибиторы факторов роста, гибридные белки и др. [1, 2].

Такие препараты являются, вероятно, самыми сложными для аналитического контроля. Согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)¹ – ОФС.1.7.2.0035.18, ОФС.1.7.1.0007.15, ОФС.1.7.1.0014.18 – допускаются различные методы подтверждения подлинности и активности: от прямой проверки специфичности до уникального анализа, основанного на водородно-деутериевом обмене. Тем не менее наиболее надежным представляется метод пептидных карт, обязательный для подтверждения подлинности моноклональных антител для медицинского применения (ОФС.1.7.1.0014.18²).

При пептидном картировании исследуемые белки или стандартный и испытуемый образцы

специфически расщепляются химически (например, с использованием BrCN) или ферментативно с помощью протеазы, чаще всего трипсина. После этого хроматографически или масс-спектрометрически регистрируются сигналы, соответствующие ожидаемым пептидам [3, 4]. Надежность анализа обеспечивается одновременной регистрацией нескольких десятков соответствующих характеристических сигналов. Масс-спектрометрия представляется наиболее предпочтительным методом анализа: высокая точность измерения масс, возможность их точного предварительного расчета обеспечивают внутри- и межлабораторную прецизионность.

При контроле качества лекарственных препаратов белковой природы кроме подтверждения подлинности важными параметрами являются определение общей концентрации белка и его активности. Для определения концентрации белков в растворах наиболее простыми и распространенными методами считаются спектрофотометрические (колориметрические). При этом необходимо, чтобы продукт и субстрат имели различающиеся спектры поглощения или флуоресценции. Если требуется, субстрат модифицируют введением специальных флуоресцирующих или поглощающих групп

¹ ОФС.1.7.2.0035.18 Пептидное картирование. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.
ОФС.1.7.1.0007.15 Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.
ОФС.1.7.1.0014.18 Моноклональные антитела для медицинского применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

² Там же.

или используют метки, селективно связывающиеся с субстратом или продуктом. Измерение активности и кинетических констант сводится к определению концентрации: в процессе реакции регистрируется изменение поглощения/флуоресценции субстрата или продукта. Очевидно, что при использовании модифицированных субстратов определяются кинетические параметры реакции с дериватом (производным), а не с нативной молекулой. Такие модификации могут серьезно влиять на значение кинетических параметров. Например, представленные в крупнейшей базе данных ферментов BRENDA³ K_M (константа Михаэлиса) и $K_{\text{кат}}$ (каталитическая константа) трипсина на несколько порядков отличаются для разных субстратов: от 0,15 мкМ до 35,5 мМ [5, 6]. Но даже незначительные модификации субстрата, например изомеризация одной аминокислоты, могут в несколько раз изменить скорость реакции [7].

Активность ферментов чаще всего определяют, используя доступные синтетические хромогенные субстраты, по химической природе существенно отличающиеся от природных субстратов. Например, определение активности трипсина согласно ГФ РФ⁴ сводится к установлению его амидазной активности с субстратом N- α -бензоил-L-аргинин-4-нитроанилидом (BAPNA) [8, 9] или, в соответствии с требованиями Фармакопеи США⁵, эстеразной активности с использованием хромогенного субстрата N- α -бензоил-L-аргинин-этилового эфира (BAEE) [10] (рис. 1). Особенностью спектрофотометрических методов является неселективность, что подразумевает невозможность определения концентрации отдельного компонента сложных смесей, например одного из пептидов, образующихся в результате гидролиза протеазой. Как правило, упомянутые методы требуют использования стандартного образца, или его наличие весьма желательно.

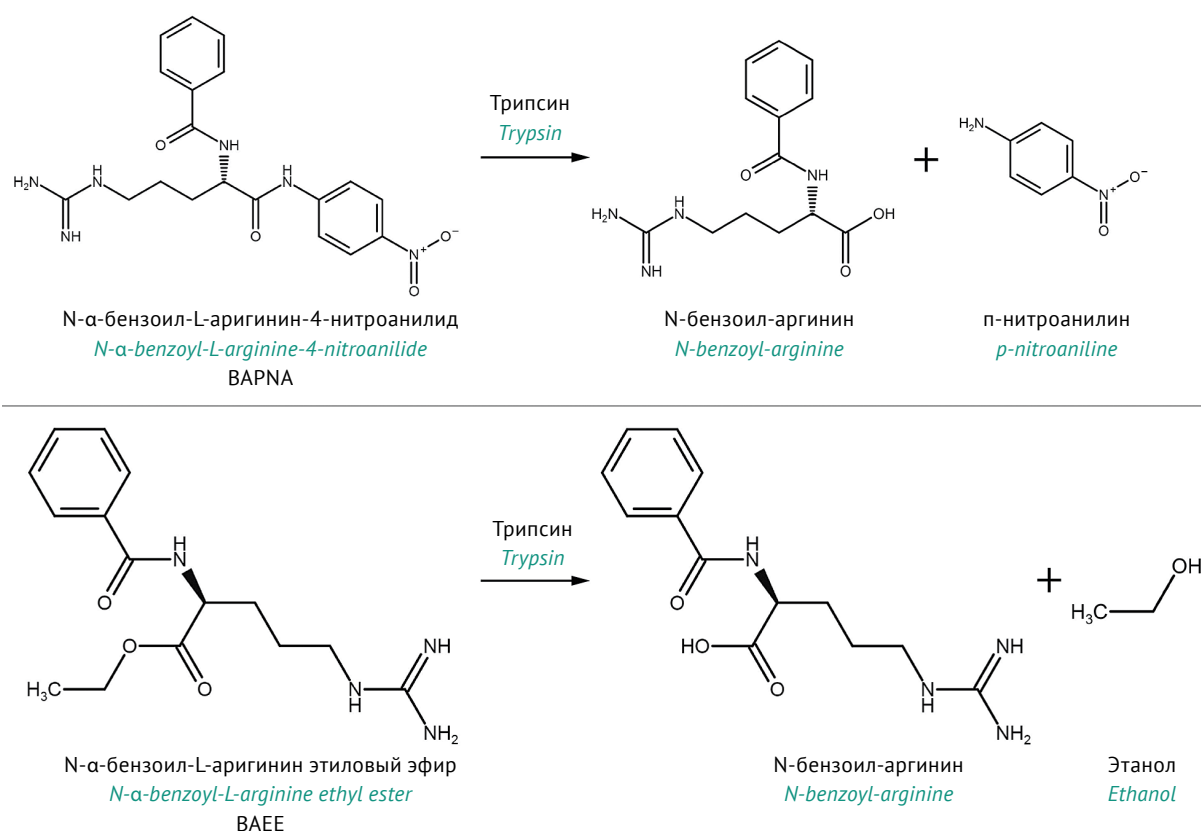


Рисунок подготовлен авторами по данным [8–10] с изменениями / The figure is adapted by the authors from [8–10]

Рис. 1. Субстраты, используемые для определения активности трипсина по продуктам, детектируемым спектрофотометрически: BAPNA (с образованием p-нитроанилина) и BAEE (с образованием N-бензоил-аргинина).

Fig. 1. Substrates used in trypsin activity assays, by products detected by spectrophotometry: BAPNA (with the formation of p-nitroaniline) and BAEE (with the formation of N-benzoyl-arginine).

³ <https://www.brenda-enzymes.org/>

⁴ ФС.2.1.0195.18 Трипсин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 3; 2018.

⁵ USP 43–NF 38 <89> Enzymes used as ancillary materials in pharmaceutical manufacturing.

Причина недостатков спектрофотометрических методов заключается в том, что при определении концентрации белков и пептидов измеряется концентрация отдельных функциональных групп: заместителей (гетероцикла тирозина и/или триптофана, содержащего ароматическую группу) или аминокрупп, модифицированных радикалами, способными поглощать излучение при определенной длине волны. Суммарно это может приводить к серьезным ошибкам.

Появившиеся в 1980-х гг. биосенсорные методы на основе эффекта поверхностного плазмонного резонанса [11] (surface plasmon resonance, SPR) и электрохимические методы с аффинными модификациями электродов используют для определения кинетических характеристик различных процессов, например констант ассоциации/диссоциации лиганд-рецепторных взаимодействий, кинетики цитохромов P450 [12] и др. Эти методы предполагают иммобилизацию молекул одного из компонентов реакции на поверхности ячейки SPR или электрода. В результате определяются характеристики гетерофазного процесса. Полученные константы оказываются несопоставимыми с константами реакций в растворе — различными оказываются даже размерности констант ($\text{M} \times \text{см}^{-2}$ и $\text{M} \times \text{мл}^{-1}$ для K_m). Ограничением электрохимических методов является необходимость присутствия электроноакцепторной группы в составе иммобилизованной молекулы [13].

Масс-спектрометрические измерения свободны от большинства перечисленных недостатков, но количественные измерения требуют дополнительных манипуляций. При выполнении масс-спектрометрического анализа на некоторые особенности метода следует обратить особое внимание. Прежде всего в масс-спектрометрии измеряется отношение массы к заряду ионов. Это значит, что в масс-спектрах регистрируются сигналы только от ионов. Образование ионов, несущих заряд производных молекул, может происходить по-разному — в результате утраты или присоединения электрона, протона анионного или катионного аддукта, например катиона натрия. Сродство различных соединений к протону или другому агенту, очевидно, не одинаково и может весьма сильно варьироваться. В результате ионизация сложных смесей сопровождается конкуренцией за заряд, а эффективность ионизации компонентов смеси оказывается зависящей от ее состава. Кроме того, в смеси могут оказаться компоненты, гасящие ионизацию, например соли или детергенты.

Таким образом, в смеси, состоящей из нескольких пептидов, интенсивности их сигналов могут

меняться от спектра к спектру вне зависимости от их концентрации в образце. Следовательно, исключительно по интенсивностям пиков в масс-спектре без образца сравнения можно только предположительно оценивать концентрации анализируемых веществ.

Это в полной мере относится к так называемым безметочным методам (label-free quantification, LFQ). Например, для оценки относительной концентрации гидролизованных белков используется индекс содержания белка (protein abundance index, PAI) [14], который представляет собой количество идентифицированных пептидов, деленное на количество теоретически наблюдаемых пептидов, или индекс PAI в экспоненциальном представлении — emPAI [15].

В масс-спектрах достаточно высокого разрешения, которые можно получить практически на любом современном масс-спектрометре, органические молекулы, в нашем случае пептиды, представлены несколькими сигналами, называемыми изотопными, которые отличаются для однозарядных ионов на 1 Да. Это следствие существования изотопов — атомов тех же элементов, но отличных по числу нейтронов в ядре. Поэтому в спектре высокого разрешения каждое соединение представлено несколькими сигналами.

Важно, что различающиеся по изотопному составу молекулы химически идентичны, и, независимо от условий регистрации спектров, в том числе состава смеси, соотношение интенсивностей изотопных сигналов не меняется. При этом изотопный состав можно изменить искусственно, заменив часть или все атомы какого-либо элемента на изотопы — ввести изотопную метку. Таким образом получают изотопно-меченый стандарт (ИМС), образец сравнения. В смеси исследуемого образца с природным изотопным распределением и ИМС соотношения изотопных пиков зависят только от того, в каких соотношениях смешаны образец и ИМС. Использование таких изотопных меток (stable isotope labelling, SIL) позволяет с высокой точностью, не хуже спектрофотометрических методов, измерять концентрации по интенсивностям масс-спектрометрических сигналов.

Можно выделить четыре группы методов введения изотопной метки в пептиды и белки:

- метаболическое мечение — культивирование организмов на средах, обогащенных тяжелыми изотопами, к примеру, с аминокислотами, содержащими тяжелые изотопы (stable isotope labelling with amino acids in cell culture, SILAC) [16] (рис. 2А);

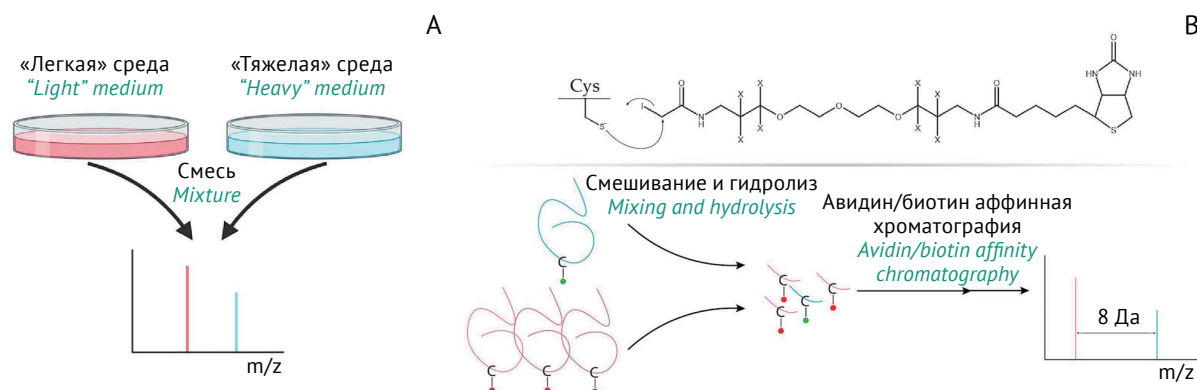


Рисунок подготовлен авторами по данным [16, 18, 19] с изменениями / The figure is adapted by the authors from [16, 18, 19]

Рис. 2. Методы изотопного мечения для количественного масс-спектрометрического анализа. А — схема метаболического мечения: синим цветом — клеточная культура на обычной среде («легкая» среда); красным цветом — среда с тяжелыми изотопами («тяжелая» среда). При сравнении двух белков, экстрагированных из клеточных культур, концентрации белков можно определить, сравнивая площади/интенсивности пиков в масс-спектре. В — тиоловые группы цистеинов модифицируются легкой ($X = {}^1\text{H}$) или тяжелой ($X = {}^2\text{H}$) метками (isotope-coded affinity tag, ICAT). Концентрации белков определяются путем сравнения площади/интенсивности пиков в масс-спектре.

Fig. 2. Isotope-labelling methods for quantitative mass-spectrometric analysis. A, metabolic labelling scheme: blue, cell growth on a conventional medium ("light" medium); red, cell growth on a medium with heavy isotopes ("heavy" medium). When comparing two proteins extracted from cell cultures, an analyst can determine protein concentrations by comparing peak areas/intensities in the mass spectrum. B, labelling of cysteine thiol groups with light ($X = {}^1\text{H}$) or heavy ($X = {}^2\text{H}$) isotopes (isotope-coded affinity tags, ICAT). Protein concentrations can be determined by comparing peak areas/intensities in the mass spectrum.

- синтез с использованием аминокислот, обогащенных тяжелым изотопом, углеродом или азотом [17];
- одновременная модификация исследуемого образца и ИМС химически идентичными, но различающимися по составу изотопов соединениями, например isotope-coded affinity tag, ICAT (рис. 2В), и другими коммерчески доступными наборами [18, 19];
- введение метки в результате изотопного обмена [20].

Первые три подхода введения изотопной метки довольно дороги и трудозатратны. Использование метода изотопного обмена позволяет получить ИМС за несколько часов и без использования редких реагентов. Изотопный обмен представляет собой спонтанный процесс выравнивания распределения изотопов в различных компонентах системы (например, между растворителем и растворенным соединением). Скорость обмена, очевидно, зависит от того, какие атомы обмениваются, и от положения этих атомов в молекуле. В нашем случае обмен происходит между водой, обогащенной ^{18}O , и кислородом в пептиде. Наиболее легко обмениваются атомы кислорода карбоксильных групп как С-концевой, так и глутаминовой и аспарагиновой аминокислот. Так как атомы кислорода карбоксильной группы равноправны, то в каждой карбоксильной группе могут обмениваться оба атома кислорода.

Изотопный обмен кислорода карбоксильных групп катализируется кислотами (кислотный катализ), а также гидролазами (например, трипсином). При катализе специфичными протеазами обмен преимущественно происходит по сайтам специфического гидролиза. Важно подчеркнуть, что трипсин катализирует обмен кислорода также в уже свободной карбоксильной группе.

Таким образом, ИМС может быть получен в результате гидролиза белка в воде или обменом отдельного пептида в воде H_2^{18}O . А для получения ИМС можно использовать любой уже имеющийся пептид, идентичный измеряемому, например синтетический.

Получение ИМС путем обмена ^{16}O на ^{18}O в молекуле пептида не требует дорогостоящих материалов и реагентов или специального синтеза пептидов. Такой ИМС можно использовать для количественного определения пептидов масс-спектрометрически. Определяя концентрацию образовавшегося через некоторое время пептида при разных концентрациях субстрата, можно масс-спектрометрически устанавливать кинетические параметры протеолитических реакций. Предложенный подход не только является альтернативой существующим методам, но и позволяет решить проблему определения активности протеаз, для которых сложно или невозможно получить специальные субстраты.

Цель работы — на примере трипсина и казеина исследовать возможность определения

активности фермента методом количественной масс-спектрометрии с меткой ^{18}O одновременно с подтверждением подлинности.

Материалы и методы

Реактивы и материалы

В качестве фермента использовали трипсин (Promega, США, кат. № v5111), а в качестве субстрата казеин (Sigma-Aldrich, США, кат. № 9005-46-3). Гидролиз проводили в бикарбонатном буферном растворе pH 7,8 (Sigma-Aldrich, США, кат. № 1066-33-7). Для очистки смеси от казеина и трипсина после гидролиза использовали центрифужные фильтры Microcon 3 кДа (Merck Millipore, США, кат. № 42404). Обмен атомов кислорода в пептидах проводили в 10% трифторуксусной кислоте, ТФУ (Merck, США, кат. № 1.08262.0025) в воде H_2^{18}O (НПО «Изотоп», Россия). В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту, DHB (Bruker Daltonics, Германия, кат. № 8201346). В качестве подвижных фаз ВЭЖХ применяли ацетонитрил (Merck, кат. № 1.00030.2500) и воду (Merck, кат. № 1.15333.2500).

Оборудование

Разделение пептидов проводили с использованием ВЭЖХ с помощью хроматографа Agilent 1100 (Agilent, США), оснащенного УФ-детектором на диодной матрице и коллектором фракций. Полученные фракции с пептидами высушивали на центрифужном концентраторе Concentrator plus (Eppendorf, Германия).

Масс-спектры получали на времяпролетном масс-спектрометре MALDI-TOF/TOF Bruker Ultraflex II (Bruker Daltonics, Германия), оборудованном Nd:YAG лазером с длиной волны 355 нм, системами задержки экстракции и tandemным селектором LIFT. Спектры регистрировали в положительных ионах в рефлекторном режиме. Каждый спектр получен суммированием серии сигналов, регистрируемых при 1000 импульсах лазера. Масс-спектры фрагментации пептидов регистрировали в tandemном режиме прибора.

Методы

Получение пептидов казеина. Пептиды для введения в них изотопной метки ^{18}O и дальнейшего использования в качестве ИМС получали гидролизом казеина (15,5 мкМ) трипсином (1,84 мкМ) в 100 мМ аммоний бикарбонатном буферном растворе pH 7,8. Гидролиз проводили в течение 30 мин при 37 °С. Пептидную фракцию полученной смеси отделяли центрифугированием с помощью Microcon 3 кДа и далее разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Luna®

C18(2) (5 мкм, 100 Å, 150×4,6 мм, Phenomenex, США, кат. № 00F-4252-E0). Фаза А — 0,1% ТФУ; фаза В — 0,1% ТФУ, растворенная в ацетонитриле; линейный градиент от 4 до 75% фазы В за 40 мин, поток 1 мл/мин, температура колонки 40 °С. Хроматограммы регистрировали при длинах волн 215 и 280 нм. Собранные на коллекторе фракции пептиды идентифицировали с использованием tandemной масс-спектрометрии MALDI TOF/TOF и высушивали на центрифужном концентраторе до остаточного объема 5 мкл. Концентрации пептидов были рассчитаны по площадям хроматографических пиков; спектрофотометрическая ячейка хроматографа предварительно откалибрована по пептидам, содержащим тирозин и/или триптофан.

Изотопный обмен. В качестве ИМС выбрали триптический пептид казеина TTMPLW с массой 747,3 Да. Для введения изотопной метки высушенные пептиды растворяли в 10% ТФУ в H_2^{18}O и инкубировали 2 ч при 60 °С.

Гидролиз белка для определения кинетики трипсина. В качестве субстрата был использован раствор казеина с концентрациями 7,75, 3,87 и 3,1 мкМ. Смешивали 16 мкл раствора казеина и 12 мкл раствора трипсина (концентрация 0,02 мг/мл) в аммоний-бикарбонатном буферном растворе pH 7,8. Смесь инкубировали в течение 15 мин.

Масс-спектрометрия MALDI. В качестве матрицы использовали 10 мкг/мл DHB, растворенной в смеси 50% ацетонитрила с 0,4% ТФУ. 0,5 мкл образца смешивали с 0,5 мкл раствора матрицы непосредственно на масс-спектрометрической мишени и высушивали на воздухе.

Количественный анализ MALDI. Для количественного масс-спектрометрического анализа от 3 до 10 мкл растворов пептидов или реакционных смесей гидролиза казеина трипсином смешивали с пептидами с внедренной меткой ^{18}O в соотношениях 1:2, 1:1, 2:1 и перемешивали. Сразу после этого к полученным смесям добавляли раствор матрицы и быстро наносили на масс-спектрометрическую мишень и высушивали на воздухе.

В качестве матрицы использовали DHB. Для каждой пробы было получено не менее трех спектров.

Результаты и обсуждение

Идентификация казеина и трипсина

Смесь продуктов гидролиза казеина трипсином содержала фрагменты, соответствующие четырем цепям этого белка. Перекрытие аминокислотной последовательности $\alpha\text{-S}_1$ казеина составило 48%, $\alpha\text{-S}_2$ казеина — 38%, β -казеина — 21%

и каппа-казеина (κ-казеина) — 28%. Пептиды автолиза трипсина перекрывали 38% его последовательности. Не все пептиды находятся в диапазоне, регистрируемом масс-спектрометрически. Если необходимо полное покрытие, используют несколько протеаз [21]. Однако такого процента покрытия может быть достаточно для подтверждения подлинности одновременно белка и фермента (особенно если комбинировать такой метод с методом tandemной масс-спектрометрии), а также подтверждения специфичности фермента.

Получение изотопно-меченого стандарта и определение его концентрации

Количественный масс-спектрометрический анализ с использованием изотопных меток позволяет определить отношение концентраций изучаемого образца к концентрации ИМС. То есть для определения концентрации изучаемого пептида необходимо и достаточно знать концентрацию ИМС. Метод определения концентрации ИМС не имеет значения, как и происхождение пептида. Важным является его химическая идентичность измеряемому образцу. Пептид может быть синтезирован химически или получен путем гидролиза субстрата и последующего выделения его продуктов на ВЭЖХ. В настоящей работе использовали второй подход, так как по мнению авторов он является более простым и удобным.

Концентрацию ИМС определяли, смешивая его с таким же природным пептидом без изотопной метки (эталоном) с известной концентрацией. Концентрацию эталона определяли по площади хроматографического пика. Зависимость концентрации от поглощения при 280 нм получена с использованием модельных триптофан-содержащих пептидов.

Концентрацию небольших пептидов, содержащих одну или несколько ароматических аминокислот, можно с высокой точностью вычислить по поглощению при длине волны 280 нм. Коэффициенты экстинкции тирозина и триптофана известны [22], при этом поглощение пептидных связей и радикалов других аминокислот при этой длине волны пренебрежимо мало. Это позволяет вычислять концентрации по площадям хроматографических пиков. Концентрация эталонного пептида без изотопной метки составила 26 мкМ (± 2 мкМ).

Следует отметить, что если задачи эксперимента позволяют выбрать пептид для измерений, то желательно избежать возможного наложения спектра с другими пептидами близкой массы. Это связано с тем, что при кислотном

катализе обмениваться будут атомы кислорода всех карбоксильных групп, а значит, спектр пептида будет расширяться в сторону больших масс.

В данной работе был выбран пептид TTMLPW (рис. 3), не содержащий аминокислот, в радикалах которых имеются карбоксильные группы, то есть аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Для контроля обмена атомов ^{16}O на изотопы ^{18}O в пептиде в течение трех часов были получены спектры (рис. 4). После одного часа инкубации замена атомов ^{16}O на их изотопы ^{18}O прошла не полностью, но через два часа площадь первого пика составила менее 1% площади пятого пика. Сравнивая площади пиков изотопных сигналов, соответствующих пептидам с одним или двумя включенными (обменяемыми) кислородами, можно определить, что в 18% молекул обменялся один атом кислорода, в 81% — два атома и в ~1% молекул не обменялось ни одного атома кислорода. Важно, что для количественной оценки пептида не обязательно использовать ИМС, в котором замена ^{16}O на ^{18}O произошла во всех молекулах пептида или полнота обмена была близкой к таковой. Полученные результаты позволили далее вычислять концентрацию исследуемого пептида, зная только концентрации ИМС и соотношения площадей изотопных пиков в масс-спектрах образцов природного пептида.

Методом tandemной масс-спектрометрии подтверждено, что в карбоксильной группе С-концевого триптофана в пептиде TTMLPW два атома ^{16}O заместились на два атома ^{18}O (рис. 5). Наблюдаемые N-концевые фрагменты исходного пептида и пептида после обмена идентичны, в то время как массы С-концевых фрагментов отличаются на 4 Да, что соответствует обмену двух атомов кислорода карбоксильной группы на ^{18}O . Несмотря на то что в пептиде имеется остаток треонина, который содержит атом кислорода в гидроксильной группе радикала, потенциально способный к обмену, этого не наблюдается, так как скорости обмена атомов разных функциональных групп различаются на несколько порядков.

Расчет концентрации пептида по изотопно-меченому стандарту

Для определения концентрации полученного ИМС его смешивали с эталонным пептидом известной концентрации, вычисленной по площади хроматографического пика. ИМС и пептид TTMLPW (продукт или эталон) желательнее смешивать в таком соотношении, чтобы интенсивности моноизотопного пика продукта и наиболее интенсивного пика ИМС с включенными ^{18}O были примерно одинаковыми. В нашем случае

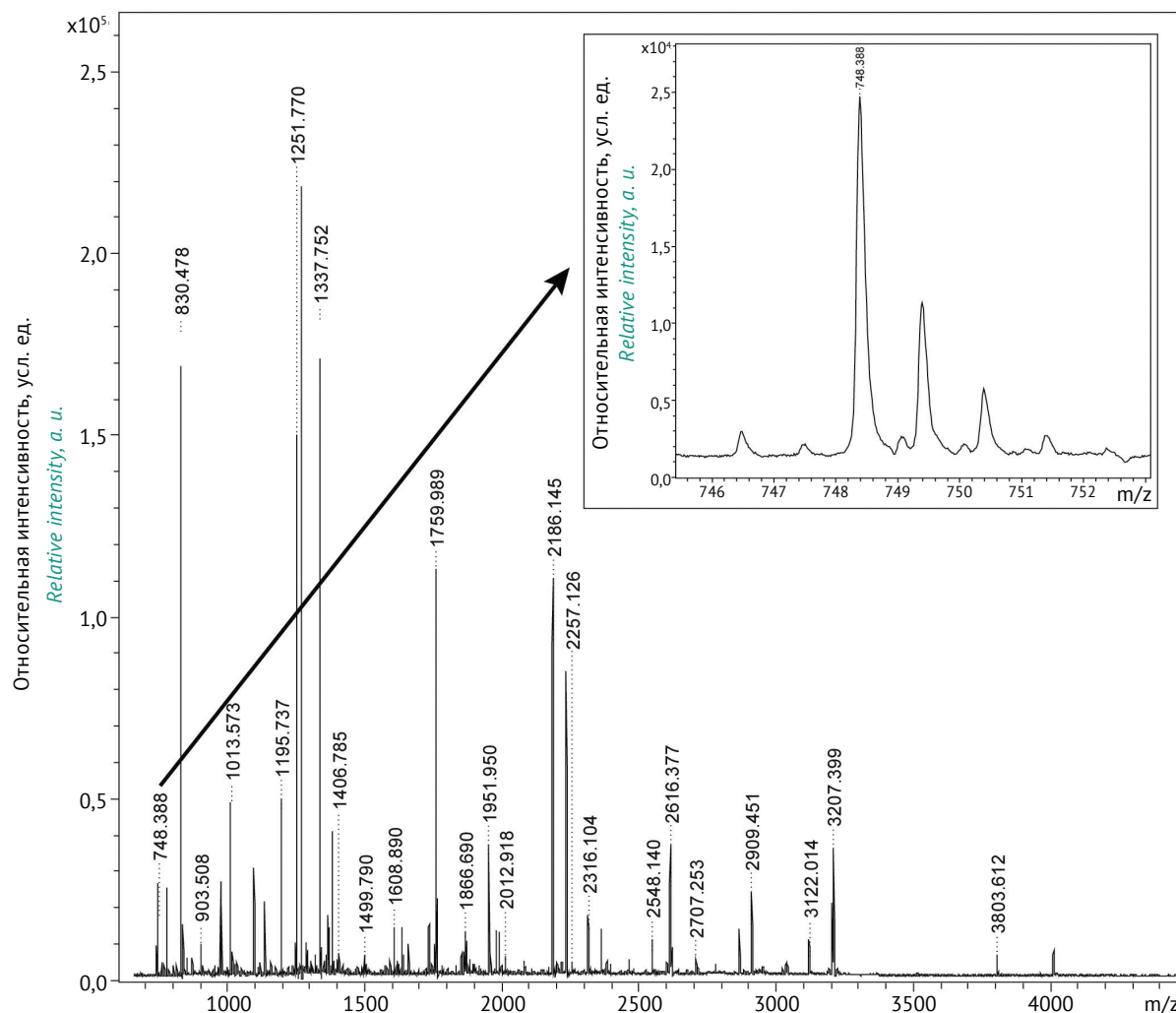


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Масс-спектр смеси продуктов трипсинолиза казеина. С правой стороны представлен масс-спектр пептида TTMPLW (молекулярная масса 747,3 Да) в увеличенном масштабе. m/z — отношение массы заряженных частиц (ионов) к их заряду.

Fig. 3. Mass spectrum of tryptic casein hydrolysates. The insert in the right upper corner shows the mass spectrum of the TTMPLW peptide (molecular weight: 747.3 Da) in a larger scale. m/z is the mass-to-charge ratio of charged particles (ions).

оптимальное соотношение продукта к ИМС составило 2:1.

Следует отметить, что при изотопном обмене сложно добиться замены только одного или только двух атомов кислорода. В результате получившийся ИМС содержит смесь всех трех изотопных форм пептида, которые накладываются в спектре: пептиды без ^{18}O , с одним изотопом ^{18}O и пептиды с двумя ^{18}O (рис. 4В и 6В). В части молекул произошла замена только одного атома кислорода карбоксильной группы на ^{18}O и привела к тому, что изотопные пики этого пептида сдвинулись на 2 атомные единицы массы (а.е.м.) вправо (рис. 6В, выделено желтым цветом). При этом соотношение интенсивностей изотопных пиков этого пептида сохраняется. В другой части молекул произошла замена обоих атомов кислорода карбоксильной группы, которая привела к тому,

что изотопные пики этого пептида сдвинулись на 4 а.е.м. (рис. 6В, выделено зеленым цветом).

Обычно удается получить ИМС, в котором практически отсутствуют пики пептида без включения ^{18}O . В этом случае отношение концентраций пептида-продукта и ИМС будет равно отношению интенсивности первого пика к сумме третьего и пятого пиков (рис. 6В). Это пики ИМС, но на них накладываются третий и пятый пик продукта, а на пятый пик (пептиды с двумя включенными изотопами ^{18}O) — еще и третий пик пептидов (пептиды с одним включенным изотопом ^{18}O). Вклады этих пептидов нужно вычесть [23] согласно формуле (1):

$$\frac{C_{\text{ИМС}}}{C_{\text{продукт}}} = \frac{q_1}{q_5 - \frac{p_5}{p_1}q_1 - \frac{p_3}{p_1}(q_3 - \frac{p_3}{p_1}q_1) + (q_3 - \frac{p_3}{p_1}q_1)}, \quad (1)$$

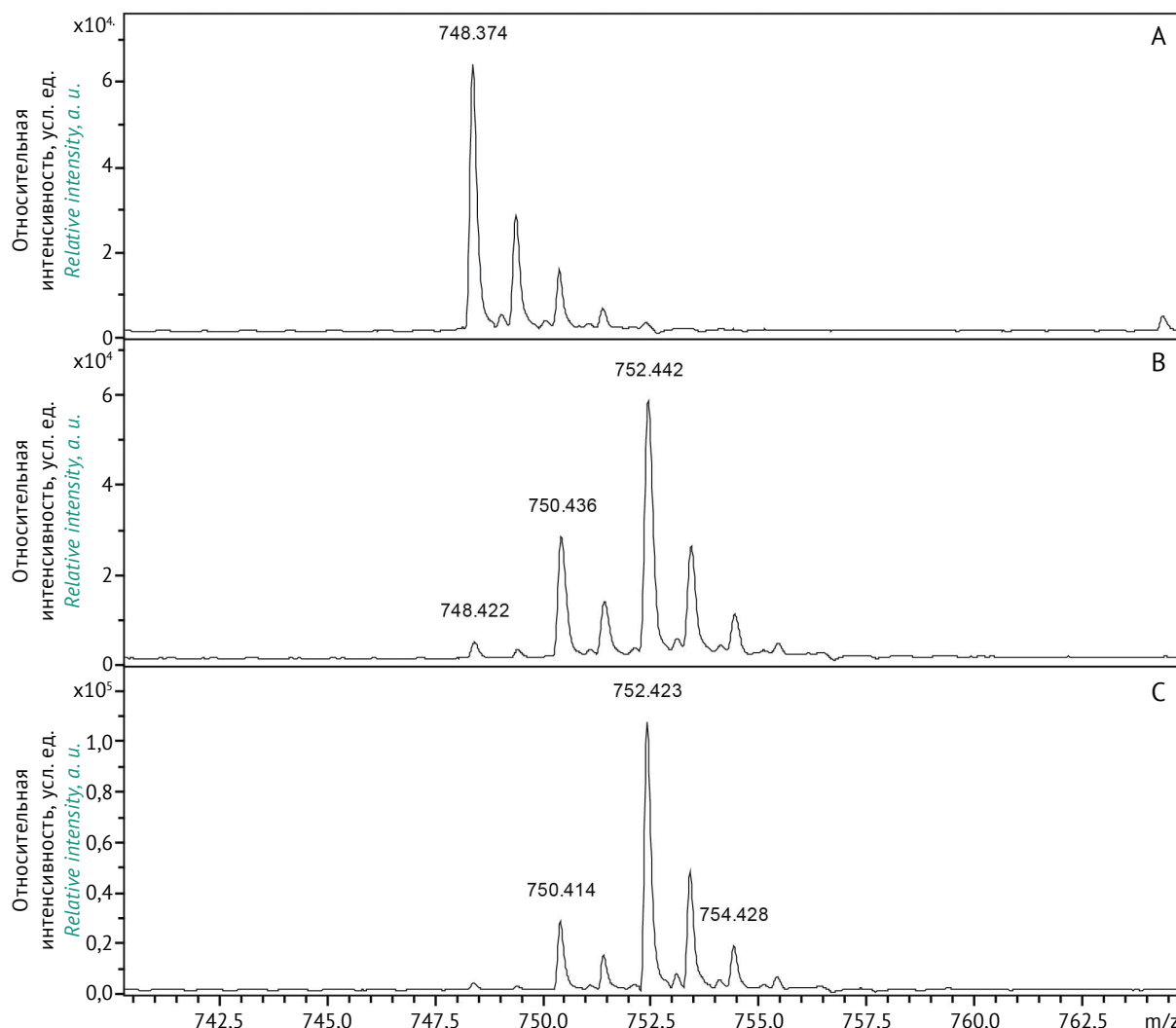


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Масс-спектры пептида TTMPLW после его перерастворения в 10% растворе трифторуксусной кислоты в H_2^{18}O через 5 мин (А), 60 мин (В) и 120 мин (С) инкубации.

Fig. 4. Mass spectra of the TTMPLW peptide redissolved in 10% trifluoroacetic acid in H_2^{18}O and incubated for 5 minutes (A), 60 minutes (B), and 120 minutes (C).

где q_1 , q_3 и q_5 — интенсивности первого, третьего и пятого сигналов в спектре смеси продукта реакции и ИМС, p_1 , p_3 и p_5 — соответствующие интенсивности сигналов в спектре исходного пептида с неизменным изотопным составом. Для проведения расчета можно не регистрировать спектр природного пептида, а взять его из другого эксперимента или рассчитать p_1 , p_3 и p_5 теоретически.

Следует отметить, что нет необходимости знать соотношение пиков в спектре ИМС, достаточно только знать, что замена атомов ^{16}O на ^{18}O произошла в большей части пептидов, а число атомов в молекуле пептида, которые могут подвергаться замене, невелико. Однако распределение в экспериментально полученных пептидах часто оказывается отличным от расчетного, что

приводит к неправильному расчету p_1 , p_3 , p_5 и увеличению ошибок в значении концентрации.

Последние ограничения не исключают возможности точного расчета концентраций: даже если ИМС будет не идеальным, в положении первого пика окажется достаточно сильный сигнал, обмен пройдет не полностью, а подвергаться замене будет большое число атомов, точный расчет концентраций все равно остается возможным — в этом случае нужно будет использовать три спектра:

- спектр пептида с замещенными на ^{18}O атомами кислорода карбоксильной группы (ИМС);
- спектр смеси ИМС и эталонного природного пептида;
- спектр смеси ИМС и пептида, полученного в результате гидролиза (продукта).

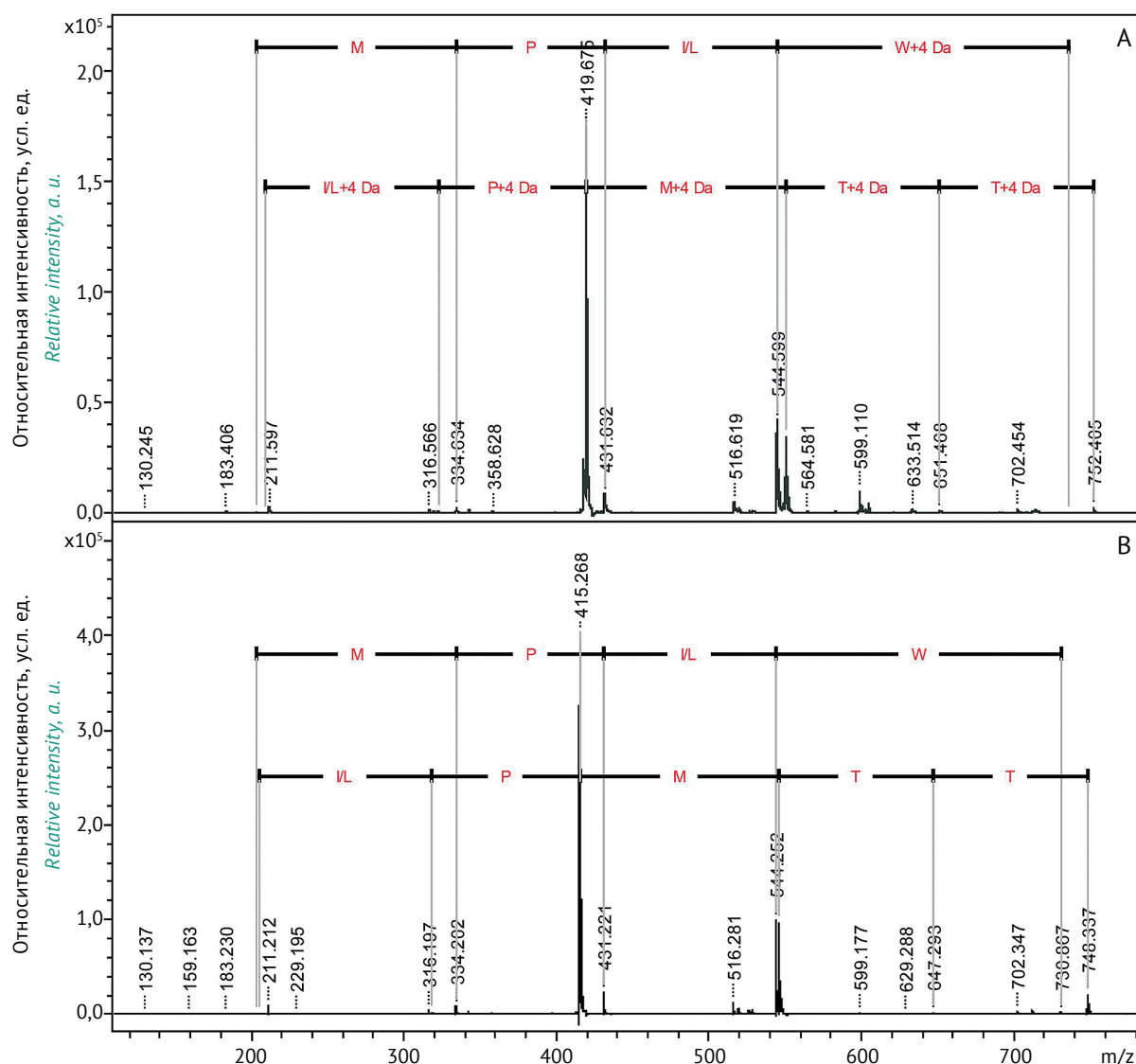


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Масс-спектры фрагментов пептида TTMPLW после инкубации в воде H_2^{18}O (A) и исходного пептида (B).

Fig. 5. Mass spectra of TTMPLW peptide fragments incubated in H_2^{18}O (A) and the intact peptide (B).

Интенсивность каждого сигнала в спектре смеси окажется суммой соответствующих сигналов эталонного пептида и ИМС с коэффициентами t и k (2):

$$\begin{cases} q_1 = kp_1 + ts_1 \\ q_2 = kp_2 + ts_2 \\ \dots \\ q_i = kp_i + ts_i \end{cases} \quad (2)$$

где q_i — интенсивность сигнала пика i в спектре смеси продукта реакции и ИМС; p_i — интенсивность сигнала пика i в спектре эталонного пептида (с неизмененным изотопным составом); s_i — интенсивность сигнала пика i в спектре ИМС.

В силу того, что в различных опытах (даже повторных) величины q_i , p_i и s_i могут сильно меняться,

рассчитанные значения коэффициентов t и k также будут изменяться. Однако, как было сказано ранее, если компоненты смеси химически идентичны, то соотношение пиков таких компонентов не меняется. Для определения концентрации пептида продукта необходимо найти отношение коэффициентов t к k , которое сохраняется для разных спектров. Чтобы найти t и k , достаточно двух уравнений; желательно выбрать два наиболее интенсивных сигнала. В нашем случае ими оказались q_1 и q_5 (3):

$$\begin{cases} q_1 = kp_1 + ts_1 \\ q_5 = kp_5 + ts_5 \end{cases} \quad (3)$$

Отношение k к t равняется отношению концентрации продукта к концентрации ИМС

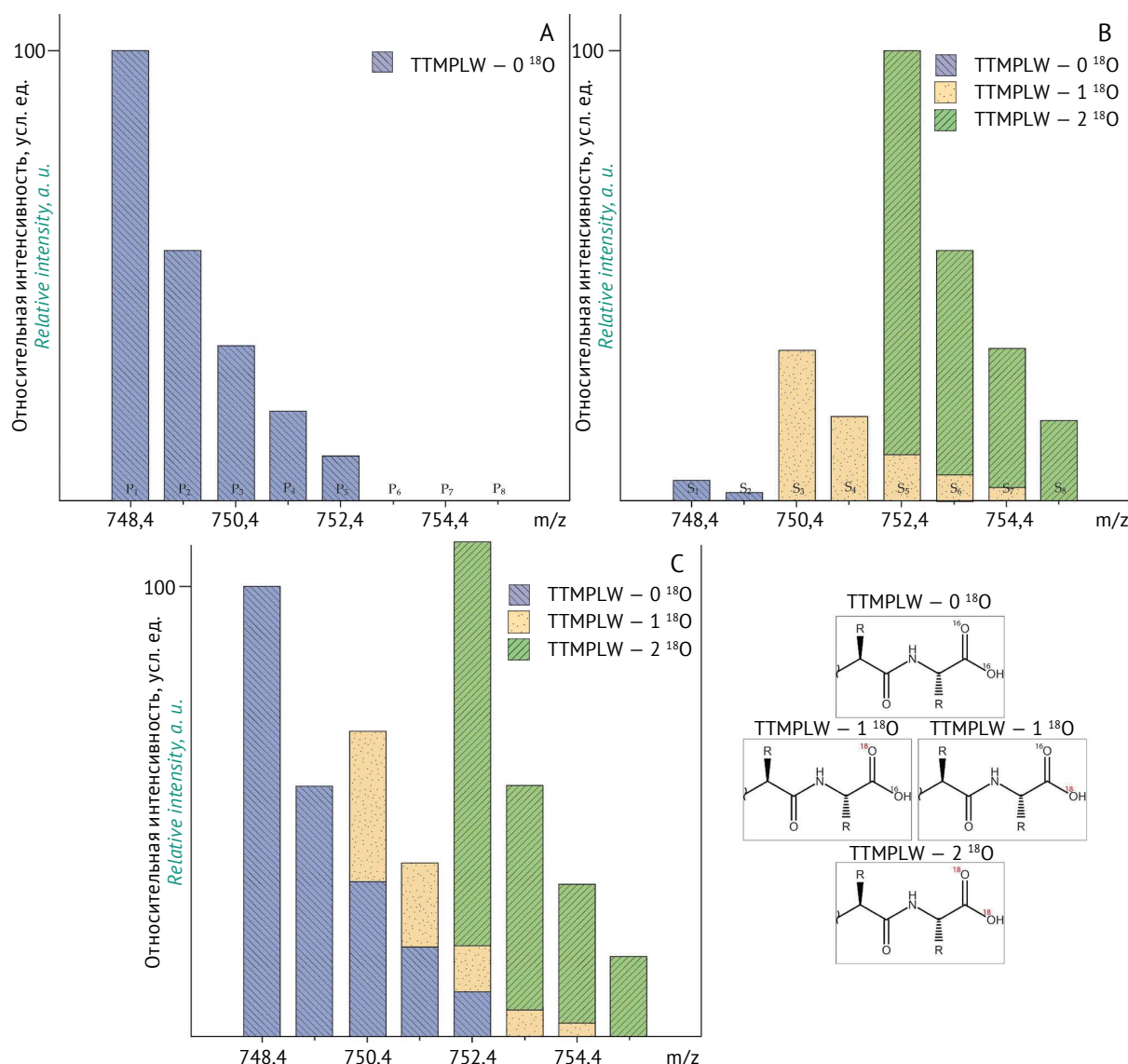


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 6. Схематическое изображение масс-спектров. А – пептид TTMLPW (продукт); В – изотопно-меченый стандарт (ИМС) с заменой одного или двух атомов ^{18}O ; С – смеси ИМС и продукта, где наглядно показано наложение относительных интенсивностей пиков ИМС и продукта. Химическими формулами изображены атомы кислорода, способные обмениваться в исследуемом пептиде.

Fig. 6. Schematic mass spectra: A, TTMLPW peptide (product); B, isotope-labelled standard peptide with one and two ^{18}O exchanges; C, mixtures of the standard peptide and the product, clearly showing the superposition of the relative intensities of the respective peaks. The chemical formulas depict the oxygen atoms in the peptide that are capable of exchange.

и находится путем решения системы линейных алгебраических уравнений согласно (4):

$$\frac{C_{\text{продукт}}}{C_{\text{ИМС}}} = \frac{k}{t} = \frac{(q_1 s_5 - q_5 s_1)(p_5 s_1 - p_1 s_5)}{(p_1 s_5 - p_5 s_1)(p_5 q_1 - p_1 q_5)} = \frac{q_1 s_5 - q_5 s_1}{p_5 q_1 - p_1 q_5}. \quad (4)$$

Поскольку пятого пика в спектре эталона мы не наблюдали ($p_5=0$), а первый пик эталона и пятый пик ИМС нормируются на 1 ($p_1=1$, $s_5=1$), то уравнение принимает вид (5):

$$\frac{C_{\text{продукт}}}{C_{\text{ИМС}}} = \frac{q_1 - q_5 s_1}{q_5}. \quad (5)$$

Определение концентрации продукта проводили при использовании этого подхода дважды – устанавливая концентрацию ИМС по спектру его смеси с эталоном и затем определяя концентрацию продукта реакции по спектру его смеси с ИМС.

Определение константы Михаэлиса трипсина

В ходе работы проводилось определение количества пептида-продукта, образующегося при гидролизе трех различных концентраций субстрата (казеина) трипсином за 15 мин. Эти данные далее использовались для измерения активности фермента.

Для более точного определения концентрации масс-спектрометрическим методом необходимо смешивать ИМС и продукт в таком соотношении, чтобы относительные интенсивности сигналов этих пептидов на масс-спектре были примерно одинаковыми. Поскольку с уменьшением количества субстрата уменьшается и количество продукта, то к образцам добавлялся ИМС с различным соотношением: для концентрации казеина 7,75 мкМ соотношение субстрата к ИМС было 1:1, а для концентраций казеина 3,87 и 3,1 мкМ – 1:2,5. Несмотря на то, что концентрацию ИМС можно посчитать из одного спектра – смеси ИМС с эталоном – более точным будет измерение концентрации ИМС масс-спектрометрически для каждого разведения (соотношения субстрат-ИМС). Поэтому концентрация ИМС, рассчитанная по спектру смеси ИМС и эталона в соотношении 1:1, составила $11,0 \pm 0,2$ мкМ, а в случае соотношения 1:2,5 – 3,8 мкМ.

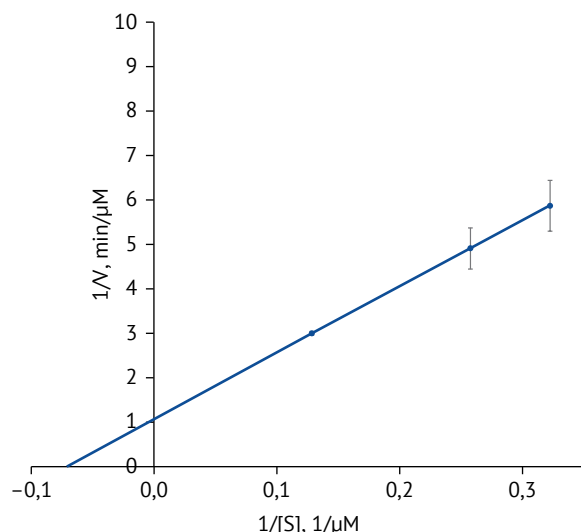


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 7. Зависимость скорости образования пептида-продукта от концентрации субстрата (казеин) в двойных обратных координатах. По оси Y – $1/\text{скорость образования продукта (мин/мкМ)}$, по оси X – $1/\text{концентрация субстрата (1/мкМ)}$.

Fig. 7. Double reciprocal plot of the product formation rate plotted against the substrate (casein) concentration. Y-axis, $1/\text{product formation rate (min/MM)}$; X-axis, $1/\text{substrate concentration (1/MM)}$.

Затем по известной концентрации ИМС была рассчитана концентрация пептида-продукта. Для концентрации казеина 7,75 мкМ она составила $5,00 \pm 0,04$ мкМ (или 0,3 мкМ/мин), для концентрации казеина 3,87 мкМ – $3,00 \pm 0,29$ мкМ (или 0,2 мкМ/мин), а для концентрации 3,1 мкМ – $2,55 \pm 0,25$ мкМ (или 0,17 мкМ/мин). Стандартное отклонение значений повторных измерений показало, что ошибка измерений оказывается меньше по сравнению со спектрофотометрическим методом, а минимальная установленная чувствительность предложенного метода составила $0,50 \pm 0,08$ мкМ. При этом чувствительность МАЛДИ масс-спектрометрии существенно выше этих значений, что указывает на возможное достижение еще более высокой чувствительности.

По полученным данным строили график зависимости скорости образования пептида-продукта от концентрации субстрата (казеин) в обратных координатах (рис. 7). Как видно из графика, наблюдается зависимость увеличения количества продукта от увеличения концентрации субстрата в обратных координатах и, следовательно, уменьшение концентрации субстрата при уменьшении концентрации фермента в прямых.

Расчет K_m при использовании описанной методики определения активности фермента показал, что K_m для трипсина составила $13,65 \pm 0,60$ мкМ. Сравнение полученного значения константы с K_m , доступными в базе данных BRENDA для казеина при сходных температурных условиях и pH, показало, что $K_m = 3,33$ мкМ [24] отличается от полученных нами данных практически в 4 раза. Возможно, это объясняется тем, что в указанной работе казеин был модифицирован меткой FITC, которая является радикалом, реагирующим с первичными аминами белков по остаткам лизина и на аминокислоте белка. Как следствие данной модификации, такой субстрат отличается от использованного нами, и, следовательно, скорость гидролиза трипсина по такому субстрату должна отличаться. Следует добавить, что активность самого фермента может отличаться для разных партий фермента даже одного производителя⁶, что также влияет на кинетические параметры.

Представленный метод введения изотопной метки является универсальным и может быть использован для любой протеазы, поскольку образующиеся в результате гидролиза пептиды имеют как минимум два атома кислорода на С-концевой карбоксильной группе, способные к обмену на изотоп ^{18}O . Также для каждой протеазы можно подобрать пептид, по которому можно проводить расчет, однако такой пептид должен отвечать ряду

⁶ <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/n/sequencing-grade-modified-trypsin-protocol.pdf?la=en>

требований. Поскольку сигналы ИМС в спектре находятся справа (соответствуют большим значениям m/z) от сигналов измеряемого пептида, желательно, чтобы в этом участке спектра отсутствовали сигналы других ионов, которые могут накладываться на сигналы ИМС. Кроме того, предложенный метод не требует специальных реактивов (например, БАЕЕ и BAPNA) и растворителей, а в качестве субстрата можно использовать любой белок. Вода, обогащенная ^{18}O , применяется в медицинской диагностике, производится в достаточно больших объемах и не требует больших затрат.

Следует отметить, что предложенный авторами в данной работе метод является ресурсозатратным, и для него необходимо наличие масс-спектрометра и хроматографа. К недостаткам также можно отнести этап подбора перед анализом пептида, по которому будут измеряться кинетические параметры.

Выводы

1. Подтверждена подлинность казеина, перекрытие аминокислотной последовательности

цепей $\alpha\text{-S}_1$, $\alpha\text{-S}_2$, β и каппа-казеина составило 48, 38, 21 и 28% соответственно. Перекрытие аминокислотной последовательности трипсина – 38%. Идентифицированные пептиды были гидролизованы по аминокислотным остаткам лизина и аргинина, что подтверждает специфичность трипсина.

2. На примере хорошо известных белка-субстрата и фермента – казеина и трипсина – показана возможность определения активности фермента альтернативным методом с использованием количественной масс-спектрометрии с меткой ^{18}O . Рассчитана константа Михаэлиса, которая составила $13,65 \pm 0,60$ мкМ.

3. Предложенный подход позволяет одновременно определять специфичность фермента и подтверждать его подлинность при масс-спектрометрическом анализе. Метод не требует использования дорогостоящих коммерческих реагентов, а также его легко адаптировать для оценки кинетических характеристик практически любой протеазы.

Литература/References

1. Lukashova EV, Babayeva G, Karshieva SS, Zhdanov DD, Pokrovsky VS. L-lysine α -oxidase: enzyme with anticancer properties. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(11):1070. <https://doi.org/10.3390/ph14111070>
2. Pokrovskaya MV, Pokrovsky VS, Aleksandrova SS, Sokolov NN, Zhdanov DD. Molecular analysis of L-asparaginases for clarification of the mechanism of action and optimization of pharmacological functions. *Pharmaceutics*. 2022;14(3):599. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030599>
3. Liska AJ, Shevchenko A. Combining mass spectrometry with database interrogation strategies in proteomics. *TrAC Trends Anal Chem*. 2003;22(5):291–8. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00507-7](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00507-7)
4. Голощапова ЕО, Рунова ОБ, Минеро АС, Фадейкина ОВ, Волкова РА, Дегтерев МБ и др. Разработка и аттестация фармакопейного стандартного образца для подтверждения подлинности первичной структуры очищенного рекомбинантного интерферона бета-1b методом пептидного картирования. *БИОпрепараты Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):23–37. Goloshchapova EO, Rounova OB, Minero AS, Fadeikina OV, Volkova RA, Degterev MB, et al. Development and certification of a pharmacopoeial reference standard for primary structure identification of purified recombinant interferon beta-1b by peptide mapping. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):23–37 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-23-37>
5. Zhang Y, Ling Z, Du G, Chen J, Kang Z. Improved production of active *Streptomyces griseus* trypsin with a novel auto-catalyzed strategy. *Sci Rep*. 2016;6(1):23158. <https://doi.org/10.1038/srep23158>
6. Huang CT. Vertebrate serum inhibitors of *Aedes aegypti* trypsin. *Insect Biochem*. 1971;1(1):27–38. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(71\)90019-9](https://doi.org/10.1016/0020-1790(71)90019-9)
7. Toropygin IYu, Kugaevskaya EV, Mirgorodskaya OA, Elisseeva YuE, Kozmin YuP, Popov IA, et al. The N-domain of angiotensin-converting enzyme specifically hydrolyzes the Arg-5-His-6 bond of Alzheimer's A β -(1-16) peptide and its isoAsp-7 analogue with different efficiency as evidenced by quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2008;22(2):231–9. <https://doi.org/10.1002/rcm.3357>
8. Li M, Rauf A, Guo Y, Kang X. Real-time label-free kinetics monitoring of trypsin-catalyzed ester hydrolysis by a nanopore sensor. *ACS Sens*. 2019;4(11):2854–7. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b01783>
9. Treetharnmathurot B, Ovartharnporn C, Wungsin-taweekul J, Duncan R, Wiwattanapatapee R. Effect of PEG molecular weight and linking chemistry on the biological activity and thermal stability of PEGylated trypsin. *Int J Pharm*. 2008;357(1–2):252–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.01.016>
10. Senphan T, Benjakul S, Kishimura H. Purification and characterization of trypsin from hepatopancreas of Pacific white shrimp. *J Food Biochem*. 2015;39(4):388–97. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12147>
11. Homola J, Yee S, Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors Actuators B Chem*. 1999;54(1):3–15. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(98\)00321-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(98)00321-9)
12. Shumyantseva VV, Kuzikov AV, Masamrekh RA, Bulko TV, Archakov AI. From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450. *Biosens Bioelectron*. 2018;121:192–204. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.040>

13. Filippova TA, Masamrek RA, Shumyantseva VV, Latis IA, Farafonova TE, Ilina IY, et al. Electrochemical biosensor for trypsin activity assay based on cleavage of immobilized tyrosine-containing peptide. *Talanta*. 2023;257:124341. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124341>
14. Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res*. 2002;12(8):1231–45. <https://doi.org/10.1101/gr.473902>
15. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4(9):1265–72. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500061-MCP200>
16. Chen X, Wei S, Ji Y, Guo X, Yang F. Quantitative proteomics using SILAC: principles, applications, and developments. *Proteomics*. 2015;15(18):3175–92. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500108>
17. Vogl DP, Conibear AC, Becker CFW. Segmental and site-specific isotope labelling strategies for structural analysis of posttranslationally modified proteins. *RSC Chem Biol*. 2021;2(5):1441–61. <https://doi.org/10.1039/D1CB00045D>
18. Chahrour O, Cobice D, Malone J. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;113:2–20. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.04.013>
19. Petrizz BA, Franco OL. Application of cutting-edge proteomics technologies for elucidating host-bacteria interactions. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2014;95:1–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800453-1.00001-4>
20. Kozmin YP, Manoilov AV, Serebryakova MV, Mirgorodskaya OA. A direct introduction of ^{18}O isotopes into peptides and proteins for quantitative mass spectroscopy analysis. *Russ J Bioorganic Chem*. 2011;37(6):719–31. <https://doi.org/10.1134/S1068162011060094>
21. Swaney DL, Wenger CD, Coon JJ. Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics. *J Proteome Res*. 2010;9(3):1323–9. <https://doi.org/10.1021/pr900863u>
22. Mach H, Middaugh CR, Lewis RV. Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. *Anal Biochem*. 1992;200(1):74–80. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90279-G](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90279-G)
23. Yao X, Freas A, Ramirez J, Demirev PA, Fenselau C. Proteolytic ^{18}O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus. *Anal Chem*. 2004;76(9):2675. <https://doi.org/10.1021/ac049600x>
24. Finehout EJ, Cantor JR, Lee KH. Kinetic characterization of sequencing grade modified trypsin. *Proteomics*. 2005;5(9):2319–21. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401268>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **М.А. Константинов** и **И.Ю. Торопыгин** – формирование концепции и дизайна работы, проведение масс-спектрометрического анализа, разделение пептидов с использованием ВЭЖХ, обработка данных, написание и редактирование текста рукописи; **Д.Д. Жданов** – формирование концепции, написание текста рукописи. **Благодарности.** Выражаем благодарность Е.В. Ивановой за помощь в подготовке рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **M.A. Konstantinov** and **I.Yu. Toropygin** conceptualised and designed the study, carried out mass-spectrometric analysis and HPLC peptide separation, processed data, drafted and edited the manuscript. **D.D. Zhdanov** conceptualised the study and drafted the manuscript.

Acknowledgements. The authors thank E.V. Ivanova for her assistance in preparing the manuscript.

Об авторах / Authors

Константинов Михаил Александрович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6051-5319>
mishanyamihail@ya.ru

Жданов Дмитрий Дмитриевич, д-р биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4753-7588>
zhdanovdd@mail.ru

Торопыгин Илья Юрьевич, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9100-9056>
toropygin@rambler.ru

Mikhail A. Konstantinov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6051-5319>
mishanyamihail@ya.ru

Dmitry D. Zhdanov, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4753-7588>
zhdanovdd@mail.ru

Ilya Yu. Toropygin, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9100-9056>
toropygin@rambler.ru

Поступила 11.07.2023

После доработки 15.01.2024

Принята к публикации 29.02.2024

Received 11 July 2023

Revised 15 January 2024

Accepted 29 February 2024

УДК 615.072:615.371:579.841.95:579.842.23
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-61-75>

Научная статья | Scientific article



Применение альтернативных методов оценки качества вакцины туляреминой живой и вакцины бруцеллезной живой по показателю «Подлинность»

И.В. Касина✉, С.А. Алексеева, Т.И. Немировская

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

✉ Касина Ирина Владимировна; kasina@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ. Применение российских диагностических препаратов для оценки качества вакцин, поиск альтернативных методов, в том числе серологических исследований (испытаний), особенно актуальны в современных условиях санкций.

ЦЕЛЬ. Показать возможность применения для оценки качества вакцины бруцеллезной живой и вакцины туляреминой живой по показателю «Подлинность» в серологических исследованиях (испытаниях) альтернативных методов: иммуноферментного анализа (ИФА), реакции агглютинации (РА), реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Применяли фармакопейный стандартный образец (ФСО) мутности бактериальных взвесей 10 МЕ; вакцину бруцеллезную живую (вакцинный штамм *Brucella abortus* 19 BA) — ФСО и две коммерческие серии; вакцины туляреминые живые (вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ) — ФСО и образец кандидата в ФСО. Все ФСО аттестованы ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Использовали российские коммерческие диагностические препараты для серологических исследований: сыворотки диагностические — поливалентную бруцеллезную сухую для РА и туляреминую сухую для РА; диагностикум эритроцитарный туляреминый иммуноглобулиновый жидкий; тест-системы диагностические для выявления в ИФА возбудителей бруцеллеза и туляремии. Статистический анализ ИФА проводили в программе Microsoft Excel ($P=0,95$), РА и РНГА оценивали качественно.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Получены положительные результаты для всех исследуемых серий: вакцины бруцеллезной живой — в РА, вакцины туляреминой живой — в развернутой РА. Во всех испытаниях в РНГА вакцины туляреминой живой (концентрация $6,25 \times 10^6$ м.к./мл, как в положительном контроле) наблюдалась гемагглютинация. Во всех испытаниях методом ИФА значения оптической плотности (D) обеих вакцин и положительного контроля были приближены: для вакцины туляреминой живой и вакцины бруцеллезной живой (цельные, концентрацией $1,0 \times 10^9$ м.к./мл) $D=2,133 \pm 0,273$ (в контроле $1,942 \pm 0,056$) и $D=0,127 \pm 0,013$ (в контроле $0,123 \pm 0,007$) соответственно. Результаты свидетельствуют о наличии в образцах бруцеллезного или туляреминого микроба, что подтверждает подлинность вакцин.

ВЫВОДЫ. Серологические испытания методами ИФА, РА и РНГА с использованием российских диагностических препаратов показали возможность их применения для оценки качества вакцины бруцеллезной живой и вакцины туляреминой живой по показателю «Подлинность». Простой визуальный учет результатов, невысокая стоимость, экономия времени и относительно большой срок годности диагностических препаратов позволяют рекомендовать РА с российскими диагностическими сыворотками как альтернативный метод для оценки качества вакцины бруцеллезной живой и вакцины туляреминой живой по показателю «Подлинность». Вследствие трудоемкости и неэкономичности методов ИФА и РНГА рекомендовать их для оценки качества вакцин нецелесообразно. Ре-

зультаты могут служить основанием для внесения метода РА в нормативные документы на вакцину бруцеллезную живую и вакцину туляреминовую живую в качестве альтернативного метода.

Ключевые слова: оценка качества вакцин; альтернативные методы; вакцина бруцеллезная живая; вакцина туляреминая живая; показатель «Подлинность»; диагностические препараты; вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ (*F. tularensis*); *Brucella abortus* 19 BA (*B. abortus*); фармакопейный стандартный образец мутности бактериальных взвесей (10 МЕ); реакция агглютинации (РА); реакция непрямой гемагглютинации (РНГА); метод иммуноферментного анализа; метод ИФА; фармакопейный стандартный образец (ФСО); серологические исследования (испытания)

Для цитирования: Касина И.В., Алексеева С.А., Немировская Т.И. Применение альтернативных методов оценки качества вакцины туляреминой живой и вакцины бруцеллезной живой по показателю «Подлинность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):61–75. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-61-75>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).

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

Application of alternative identification methods for live tularaemia and brucellosis vaccines

Irina V. Kasina , Svetlana A. Alekseeva, Tatiana I. Nemirovskaya

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

 Irina V. Kasina; kasina@expmed.ru

ABSTRACT

SCIENTIFIC RELEVANCE. The sanctions currently imposed on the Russian Federation require using Russian diagnostic products in vaccine quality assessments, as well as searching for alternative testing methods, in particular, serological ones.

AIM. This study aimed to demonstrate the possibility of using alternative serological methods, including immunoenzymatic, direct agglutination, and indirect haemagglutination methods, for the identification of tularaemia and brucellosis vaccines in studies and quality assessments.

MATERIALS AND METHODS. This study used the established pharmacopoeial reference standard (RS) for the bacterial suspension opacity of 10 international opacity units, the established pharmacopoeial RS for and two commercial batches of the live brucellosis vaccine (*Brucella abortus* 19 BA), and the established and candidate pharmacopoeial RSs for the live tularaemia vaccine (*Francisella tularensis* 15 NIEG). These pharmacopoeial RSs were certified by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Serological testing used Russian commercial diagnostic products, including dry diagnostic sera (polyvalent brucellosis and tularaemia sera for agglutination tests), a liquid erythrocytic diagnostic preparation of tularaemia immunoglobulin, and enzyme immunoassay (ELISA) diagnostic kits for detecting the causative agents for brucellosis and tularaemia. Statistical analysis involved using Microsoft Excel ($P=0.95$) for ELISA results and qualitative evaluation for the results of direct agglutination and indirect haemagglutination tests.

RESULTS. All the tested batches demonstrated positive results. Live brucellosis vaccine batches showed positive results in the slide agglutination tests, while live tularaemia vaccine batches yielded positive results in the tube agglutination tests. All indirect haemagglutination tests showed haemagglutination in live tularaemia vaccine samples at the same concentration as positive control samples (6.25×10^6 cells/mL). ELISA tests showed similar optical density values (D)

for the two vaccines and positive control samples. Live tularaemia and brucellosis vaccines (undiluted, 1.0×10^9 cells/mL) had $D=2.133 \pm 0.273$ and $D=0.127 \pm 0.013$, whereas the corresponding control samples had $D=1.942 \pm 0.056$ and $D=0.123 \pm 0.007$, respectively. The results reflected the presence of brucellosis or tularaemia microbes in the samples, confirming the identity of the vaccines.

CONCLUSIONS. Serological immunoenzymatic, direct agglutination, and indirect haemagglutination methods with Russian diagnostic products can be used to identify live brucellosis and tularaemia vaccines during quality assessment. The agglutination method with Russian diagnostic sera can be recommended as an alternative quality assessment method for the identification of live brucellosis and tularaemia vaccines, as this method offers time efficiency, simple visual evaluation of results, and low costs and relatively long shelf lives of diagnostic products. However, ELISA and indirect haemagglutination methods cannot be recommended for this purpose because of their labour-intensive and uneconomical nature. The results of this study may support the introduction of the agglutination method in the regulatory documents for live brucellosis and tularaemia vaccines (as an alternative method).

Keywords: vaccine quality assessment; alternative methods; live brucellosis vaccine; live tularaemia vaccine; identity; diagnostic reagents; direct agglutination, *Francisella tularensis* 15 NIEG; *Brucella abortus* 19 BA; pharmacopoeial reference standard for the bacterial suspension opacity of 10 international opacity units; agglutination; indirect haemagglutination; enzyme immunoassay; ELISA; pharmacopoeial reference standard; serological testing

For citation: Kasina I.V., Alekseeva S.A., Nemirovskaya T.I. Application of alternative identification methods for live tularaemia and brucellosis vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):61–75. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-61-75>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00026-24-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D reporting No. 124022200103-5).

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

Введение

Подлинность биологического лекарственного препарата – один из основных показателей его качества, который подтверждается при помощи различных лабораторных методов в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации¹ (ГФ РФ). Согласно этим требованиям для вакцины туляреминой живой² и вакцины бруцеллезной живой³ испытание качества по показателю «Подлинность» проводится иммунофлуоресцентным методом при помощи коммерческих диагностических препаратов – иммуноглобулинов флуоресцирующих. Альтернативные методы испытаний в ГФ РФ не предусмотрены.

В продолжение поиска перспективных направлений по совершенствованию экспертизы качества биопрепаратов против особо опасных инфекционных заболеваний нами была предпринята попытка использования коммерческих тест-систем и диагностических препаратов отечественного производства

(в качестве альтернативы иммуноглобулинам диагностическим флуоресцирующим) для определения показателя «Подлинность» вакцины туляреминой живой и вакцины бруцеллезной живой. Ранее нами опубликованы результаты успешного применения иммунохроматографической тест-системы (ИХ-тест) для испытания качества вакцины туляреминой живой по показателю «Подлинность» [1]. Далее был проведен анализ отечественных коммерческих диагностических препаратов и тест-систем, предназначенных для выявления и идентификации антигенов возбудителей туляремии (*Francisella tularensis*) и бруцеллеза (*Brucella abortus*) [2–7]. В качестве возможной альтернативы в испытаниях туляреминой и бруцеллезной вакцин по показателю «Подлинность» выбраны коммерческие диагностические препараты, основанные на реакции агглютинации (РА), реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и иммуноферментного анализа (ИФА) Данные препараты успешно

¹ ОФС.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

² ФС.3.3.1.0019.15 Вакцина туляреминая живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

³ ФС.3.3.1.0011.15 Вакцина бруцеллезная живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

применяются в лабораторной диагностике бруцеллеза и туляремии [8–10].

Цель работы — показать возможность применения для оценки качества вакцины бруцеллезной живой и вакцины туляремийной живой по показателю «Подлинность» в серологических исследованиях (испытаниях) альтернативных методов иммуоферментного анализа, реакции агглютинации, реакции непрямого гемагглютинации.

Для выполнения поставленной цели необходимо решение следующих задач:

- выявление бруцеллезного антигена в вакцине бруцеллезной живой в РА и ИФА с помощью российских диагностических препаратов;
- выявление туляремийного антигена в вакцине туляремийной живой в РА, РНГА и ИФА с помощью российских диагностических препаратов.

Материалы и методы

Материалы

В этой работе авторский коллектив впервые для испытания вакцины туляремийной живой и вакцины бруцеллезной живой по показателю «Подлинность» применил коммерческие диагностические препараты, предназначенные для выявления антигенов возбудителя туляремии или бруцеллеза и основанные на альтернативных методах серологических исследований (испытаний).

В исследованиях использовали следующие материалы:

- вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и кожного скарификационного нанесения, серия О119 и О120 (АО «НПО «Микроген», Россия) на основе вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА;
- фармакопейный стандартный образец вакцины бруцеллезной живой, ФСО 3.2.00396 (ОСО 42-28-396, 2021) серии 7 (далее — ФСО вакцины бруцеллезной) (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России);
- сыворотка диагностическая поливалентная бруцеллезная сухая для РА по ТУ 9388-011-01898090-2011 (далее — сыворотка бруцеллезная), рег. № ФСР 2012/13323, серия 10 (ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Россия); сыворотка получена из крови кроликов, гипериммунизированных культурой бруцеллезного микроба (вакцинный штамм *B. abortus* 19 ВА), инактивированной формалином или кипячением;
- набор реагентов «Тест-система диагностическая для выявления возбудителя бруцеллеза в ИФА» (ИФА-Бру-СтавНИПЧИ) по ТУ 9398-011-01897080-2009, рег. № ФСР 2010/06745, серия 1-21 (ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия);
- фармакопейный стандартный образец вакцины туляремийной живой ФСО 3.2.00398 (ОСО 42-28-398), серия 011-011221 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) (далее — ФСО вакцины туляремийной); на основе вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ;
- кандидат в фармакопейный стандартный образец вакцины туляремийной живой ФСО 3.2.00398 (ОСО 42-28-398) серии 012;
- фармакопейный стандартный образец мутности бактериальных взвесей 10 МЕ ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) (далее — ФСО мутности 10 МЕ) для определения мутности бактериальных взвесей методом визуального сравнения;
- сыворотка диагностическая туляремийная сухая для РА по ТУ 8852-003-01898090-2010 (рег. № ФСР 2011/10029) серия 203 (ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Россия); сыворотка получена из крови лошади, гипериммунизированной вирулентной инактивированной культурой *F. tularensis*;
- набор реагентов «Тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии методом ИФА» (ИФА-Тул-СтавНИПЧИ) по ТУ 9398-010-01897080-2009 (рег. № ФСР 2010/06744) серия 2-22 (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия);
- набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый жидкий» (РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ) по ТУ 9388-023-01897080-2010 (рег. № ФСР 2011/10271) серия 2-22 (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия); представляет собой туляремийные иммуноглобулины, сорбированные на активированных эритроцитах крови барана.

ская для выявления возбудителя бруцеллеза в ИФА» (ИФА-Бру-СтавНИПЧИ) по ТУ 9398-011-01897080-2009, рег. № ФСР 2010/06745, серия 1-21 (ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия);

- фармакопейный стандартный образец вакцины туляремийной живой ФСО 3.2.00398 (ОСО 42-28-398), серия 011-011221 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) (далее — ФСО вакцины туляремийной); на основе вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ;
- кандидат в фармакопейный стандартный образец вакцины туляремийной живой ФСО 3.2.00398 (ОСО 42-28-398) серии 012;
- фармакопейный стандартный образец мутности бактериальных взвесей 10 МЕ ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) (далее — ФСО мутности 10 МЕ) для определения мутности бактериальных взвесей методом визуального сравнения;
- сыворотка диагностическая туляремийная сухая для РА по ТУ 8852-003-01898090-2010 (рег. № ФСР 2011/10029) серия 203 (ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Россия); сыворотка получена из крови лошади, гипериммунизированной вирулентной инактивированной культурой *F. tularensis*;
- набор реагентов «Тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии методом ИФА» (ИФА-Тул-СтавНИПЧИ) по ТУ 9398-010-01897080-2009 (рег. № ФСР 2010/06744) серия 2-22 (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия);
- набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый жидкий» (РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ) по ТУ 9388-023-01897080-2010 (рег. № ФСР 2011/10271) серия 2-22 (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия); представляет собой туляремийные иммуноглобулины, сорбированные на активированных эритроцитах крови барана.

Оборудование

Регистрацию результатов ИФА проводили при помощи микропланшетного спектрофотометра SPECTROstar® Nano производителя BMG LABTECH (Германия) при длине волны $\lambda=492$ нм.

Методы

Серологические исследования (испытания) образцов вакцин проводили с применением альтернативных методов ИФА РА, РНГА, с использованием российских диагностических препаратов и тест-систем в соответствии с инструкциями производителей. Как вакцина туляремиальная живая, так и вакцина бруцеллезная живая представляют собой лиофилизированные в стабилизирующей среде взвеси живых микробных клеток вакцинных штаммов *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *B. abortus* 19 ВА в определенной концентрации. В ходе работы их восстанавливали в 0,9% растворе NaCl до нужных концентраций, указанных в инструкциях по применению каждого диагностического набора, или использовали в цельном (неразбавленном) виде. Далее образцы испытывали в соответствии с инструкциями.

1. Выявление бруцеллезного антигена в вакцине бруцеллезной живой альтернативными методами

1.1. Реакция агглютинации с применением российского диагностического препарата – сыворотки поливалентной бруцеллезной сухой. Метод основан на взаимодействии клеток бруцеллезного микроба с антителами, содержащимися в поливалентной бруцеллезной сыворотке, с образованием агглютината, видимого невооруженным глазом, в РА на стекле и в пробирке.

Рабочий титр сыворотки (серия 10) в РА на стекле – 1:25, в развернутой (в пробирках) РА – 1:800.

Реакцию агглютинации на стекле считают положительной при появлении в течение 2–3 мин агглютината, ясно видимого невооруженным глазом. При отрицательной реакции смесь сыворотки с культурой остается равномерно мутной. Контроль культуры должен оставаться равномерно мутным.

Результаты развернутой реакции агглютинации (в пробирках) оценивают визуально и считают положительными, если ясно видна невооруженным глазом крупно- или мелкозернистая агглютинация при полном просветлении надосадочной жидкости (картина соответствует 4 крестам по 4-крестовой системе оценки⁴) и при легкой опалесценции надосадочной жидкости (3 креста). Исследуемая культура может быть отнесена к бруцеллам, если дает положительную РА не менее чем на 2 креста

(слабая агглютинация, надосадочная жидкость непрозрачная) в разведении сыворотки не менее 1:800 при отрицательных контрольных реакциях. В контрольных пробирках (контроль культуры и контроль сыворотки) не должно быть агглютината и хлопьев. Если в контрольной пробирке с культурой и 0,9% раствором NaCl обнаруживается агглютинат, реакция оценивается как неспецифическая.

В описываемом исследовании использовали взвеси вакцины бруцеллезной цельной неразведенной, приготовленной по ФСО мутности 10 МЕ, что соответствует концентрации микробных клеток в 1 мл (м.к./мл) вакцины, равной $1,7 \times 10^9$ м.к./мл. Для приготовления нужных взвесей вакцину восстанавливали в 1 мл 0,9% раствора NaCl, затем разводили в 0,9% раствора NaCl до нужных концентраций микробных клеток. Испытания проводили 3 аналитика: 3 серии вакцин, каждая в 3-х повторностях.

1.2. Метод иммуноферментного анализа с применением тест-системы «ИФА-Бру-СтавНИПЧИ».

Метод основан на непрямом варианте ИФА: при постановке опыта бруцеллезный антиген, содержащийся в исследуемом материале, специфически взаимодействует с бруцеллезными иммуноглобулинами, сорбированными на планшете. Образовавшийся комплекс «антиген – антитело» выявляют с помощью конъюгата (бруцеллезные антитела, иммобилизованные и меченые пероксидазой хрена). Тест-система выявляет штаммы бруцеллезного микроба в концентрации $1,0 \times 10^6$ м.к./мл и не выявляет гетерологичных штаммов в концентрации $1,0 \times 10^8$ м.к./мл.

Поскольку целью ставилось подтверждение подлинности бруцеллезного штамма в вакцине, а не выявление его в минимальных концентрациях в диагностических целях, то для испытания готовили взвеси вакцины в 0,9% растворе NaCl по ФСО мутности 10 МЕ, соответствующие концентрациям микробных клеток (бруцелл) – $1,7 \times 10^9$ и $1,0 \times 10^9$ м.к./мл, и взвесь цельной вакцины. Для приготовления нужных взвесей вакцину восстанавливали в 1 мл 0,9% раствора NaCl, затем разводили в 0,9% раствора NaCl до нужных концентраций микробных клеток. Опыты ставили в соответствии с инструкцией по применению набора. Испытание проводили на 2-х образцах каждой серии вакцины, все в 2-х повторностях.

⁴ Оценка реакции агглютинации по 4-крестовой схеме: 4 креста (++++), полное просветление надосадочной жидкости, крупно- или мелкозернистая агглютинация на дне в виде зонтика; 3 креста (+++), легкая опалесценция, неполное просветление и надосадочной жидкости, хорошо выраженный зонтик агглютината; 2 креста (++) – неполное просветление жидкости, слабая агглютинация – зонтик умеренно выражен; 1 крест (+) – следы агглютинации, надосадочная жидкость непрозрачная; «–» – отрицательный результат: агглютинация не наблюдается, жидкость равномерно мутная.

Регистрацию и расчет результатов ИФА проводили с помощью микропланшетного спектрофотометра SPECTROstar® Nano при длине волны $\lambda=492$ нм. Длительность процедуры измерения оптической плотности не превышала 15 мин. Результаты считали положительными, если оптическая плотность образцов в 2 и более раз превышала оптическую плотность отрицательного контроля.

2. Выявление туляреминого антигена в вакцине туляреминой живой альтернативными методами

2.1. Реакция агглютинации с применением сыворотки туляреминой. Метод основан на взаимодействии антигенов туляреминого микроба с антителами, содержащимися в туляреминой сыворотке, с образованием агглютината, видимого невооруженным глазом, в развернутой РА (в пробирках).

Значение рабочего титра сыворотки серии 203 в развернутой (в пробирках) РА составило 1:3200. Реакцию считают положительной, если ясно видна невооруженным глазом крупно- или мелкозернистая агглютинация (не менее, чем на 2 креста). Исследуемая культура может быть отнесена к туляреминому микробу, если РА с сывороткой оценивается не менее чем на 2 креста со значениями титра до 1:3200 или 1:1600 для данной серии. В контрольных пробирках (контроль культуры и контроль сыворотки) не должно быть агглютината и хлопьев. Если в контрольных пробирках обнаруживается агглютинат, реакция оценивается как неспецифическая.

Вакцину туляреминой живой разводили по ФСО мутности 10 МЕ до концентрации туляреминого микроба, равной $5,0 \times 10^9$ м.к./мл. К 0,5 мл каждого разведения сыворотки добавляли по 0,5 мл вакцинной взвеси, получая разведения сыворотки от 1:100 до 1:3200 (рабочее разведение сыворотки). Одновременно ставили контрольные опыты: контроль антигена и контроль сыворотки. Испытания проводили 3 аналитика. Для РА развернутым методом (в пробирках) каждый аналитик использовал 3 образца каждой из 2-х испытуемых серий вакцины туляреминой живой (ФСО 3.2.00398 и кандидат в ФСО 3.2.00398) и 3 образца сыворотки туляреминой серии 203.

2.2. Метод иммуноферментного анализа с применением тест-системы «ИФА-Тул-СтавНИПЧИ». При постановке метода непрямого ИФА туляреминый антиген, содержащийся в исследуемом материале, специфически взаимодействовал с туляремиными иммуноглобулинами,

сорбированными на планшете. Образовавшийся комплекс «антиген – антитело» выявляют с помощью конъюгата (туляреминые антитела, иммобилизованные и меченые пероксидазой хрена). Тест-система выявляет штаммы туляреминого микроба в концентрации $1,0 \times 10^6$ м.к./мл и не выявляет гетерологичные штаммы в концентрации $1,0 \times 10^8$ м.к./мл.

Для испытания приготовили взвеси вакцины с концентрацией микробных клеток (вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ) в 0,9% растворе NaCl по ФСО мутности 10 МЕ, равной $5,0 \times 10^9$ и $1,0 \times 10^9$ м.к./мл, инактивированные нагреванием в соответствии с инструкцией по применению на тест-систему, и неинактивированные. Пробы вакцины исследовали в соответствии с инструкцией по применению набора. Испытание каждого разведения 2-х серий вакцины проводили в 2-х повторностях.

Регистрацию результатов ИФА проводили на микропланшетном спектрофотометре SPECTROstar® Nano при длине волны $\lambda=492$ нм. Длительность процедуры измерения оптической плотности не превышала 15 мин. Результаты считали положительными, если оптическая плотность образцов в 2 и более раз была больше оптической плотности отрицательного контроля.

2.3. Реакция непрямого гемагглютинации с применением набора «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ».

При постановке РНГА туляреминый антиген, содержащийся в исследуемом материале, специфически взаимодействует с туляремиными иммуноглобулинами, сорбированными на активированных эритроцитах барана. Эритроциты выпадают на дно лунок равномерным слоем в виде «зонтика», занимая не менее 2/3 диаметра сферической поверхности в лунке (в ряде случаев отмечается фестончатое оплывание краев агглютината). При отрицательном результате эритроциты выпадают на дно лунки в виде пуговки или узкого колечка с ровным краем. Диагностикум выявляет в РНГА штаммы туляреминого микроба в разведении $3,12 \times 10^6$ м.к./мл (макрометод) и в разведении $6,25 \times 10^6$ м.к./мл (микрометод) и не выявляет гетерологичные штаммы в разведении $1,0 \times 10^8$ м.к./мл. Определение специфичности РНГА проводили в реакции торможения непрямого гемагглютинации (РТНГА). В качестве положительного контроля выступала прикладываемая к набору инактивированная взвесь туляреминого микроба в концентрации $1,0 \times 10^9$ м.к./мл, которую перед постановкой испытания разводили 0,9% раствором NaCl до концентрации $5,0 \times 10^7$ м.к./мл.

Для испытания в РНГА и РТНГА (для подтверждения специфичности РНГА) готовили взвеси вакцины туляреминой по ФСО мутности 10 МЕ, соответствующей концентрации $5,0 \times 10^9$ м.к./мл, затем их разводили в 0,9% растворе NaCl до концентрации $5,0 \times 10^7$ м.к./мл. В испытании применяли взвеси вакцины: инактивированные в соответствии с инструкцией по применению на диагностикум и неинактивированные. Три аналитика проводили испытание 2-х серий вакцины (ФСО 3.2.00398 и кандидат в ФСО 3.2.00398) на 2-х образцах (инактивированные и неинактивированные вакцины), все в 2-х повторностях.

Статистическая обработка данных

Методы РА и РНГА дают качественные реакции образования комплексов «антиген – антитело», результаты оценивали визуально, поэтому статистическую обработку не проводили.

Результаты, полученные методом ИФА, оценивали статистически при помощи программы Microsoft Office Excel. Определяли погрешности значений результатов ИФА с доверительной вероятностью 95%.

Результаты и обсуждение

1. Результаты оценки качества вакцины бруцеллезной живой по показателю

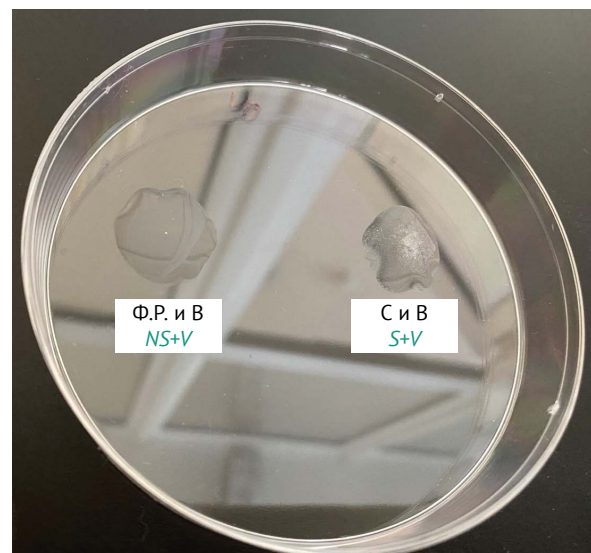
«Подлинность» альтернативными методами

1.1. Реакция агглютинации с применением российского диагностического препарата – сыворотки диагностической поливалентной бруцеллезной сухой. При испытании цельной (неразведенной) вакцины бруцеллезной живой с помощью сыворотки бруцеллезной в разведении 1:25 были получены положительные результаты РА на стекле для всех исследуемых серий. В течение 2–3 мин во всех постановках появился агглютинат, ясно видимый невооруженным глазом. В контроле смесь вакцины и 0,9% раствора NaCl осталась равномерно мутной (рис. 1, табл. 1).

В испытании образцов разведенных вакцин, соответствующих 10 МЕ по ФСО мутности, во всех образцах появился агглютинат, ясно видимый невооруженным глазом. Однако, в отличие от опытов с неразведенной вакциной, РА в случаях разведения прошла с большой задержкой по времени: положительные результаты для всех исследуемых серий были получены только через 30 мин. Исходя из полученных результатов авторы рекомендуют проводить РА на стекле со взвесью неразведенной восстановленной вакцины (табл. 1). В контроле (вакцина и 0,9% раствор NaCl) смесь остается равномерно мутной.

При постановке развернутой РА (в пробирках) получены положительные результаты РА со всеми образцами бруцеллезной вакцины и сыворотки (табл. 2). Наблюдалась крупнозернистая агглютинация (4 креста) при полном просветлении надосадочной жидкости в титре сыворотки 1:400, а также мелкозернистая агглютинация при легкой опалесценции надосадочной жидкости (3 креста) в рабочем разведении сыворотки бруцеллезной 1:800. Как следует из инструкции по применению сыворотки бруцеллезной, исследуемая культура может быть отнесена к бруцеллам, если дает положительную РА в разведении не менее 1:800 при отрицательных контрольных реакциях.

В контрольных пробирках (контроль культуры и контроль сыворотки) агглютината и хлопьев не обнаружено. В контрольных по сыворотке опытах раствор оставался прозрачным, в контрольных по вакцине – взвесь осталась равномерно мутной.



Фотография выполнена авторами / The photograph is taken by the authors

Рис. 1. Результаты испытания вакцины бруцеллезной живой по показателю «Подлинность» в реакции агглютинации на стекле. Учет через 2–3 мин. Ф.Р. и В – контроль: 0,9% раствор NaCl (Ф.Р.) со взвесью восстановленной цельной вакцины (В), видно отсутствие агглютинации; С и В – опыт: взвесь восстановленной цельной вакцины (В) с диагностическим препаратом сыворотки (С) бруцеллезной в разведении 1:25, наблюдается крупнозернистая агглютинация при полном просветлении жидкости.

Fig. 1. Results of live brucellosis vaccine identification by slide agglutination with examination after 2–3 min. NS+V, control sample (0.9% NaCl solution (NS) with undiluted vaccine suspension (V)); no agglutination. S+V, test sample (reconstituted undiluted vaccine suspension (V) with brucellosis serum diagnostic reagent (S) at a dilution of 1:25); coarse agglutination with complete liquid clarification.

Таблица 1. Результаты оценки качества вакцины бруцеллезной живой по показателю «Подлинность» в реакции агглютинации на стекле**Table 1.** Results of live brucellosis vaccine identification by slide agglutination

Повторность* <i>Replicate*</i>	Визуальная оценка РА** <i>Visual evaluation of agglutination**</i>							
	ФСО <i>RS</i>		O119		O120		Контроль*** <i>Control***</i>	
	Ц <i>UD</i>	10 ME <i>10 IU</i>	Ц <i>UD</i>	10 ME <i>10 IU</i>	Ц <i>UD</i>	10 ME <i>10 IU</i>	К _ц <i>C_{UD}</i>	К _{10 ME} <i>C_{10 IU}</i>
1	+	–	+	–	+	–	–	–
2	+	–	+	–	+	–	–	–
3	+	–	+	–	+	–	–	–

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

Примечание. РА — реакция агглютинации; ФСО — ФСО 3.2.00396 вакцины бруцеллезной живой (I аналитик); O119 (II аналитик), O120 (III аналитик) — коммерческие серии вакцины бруцеллезной живой; Ц — восстановленная цельная (неразбавленная) вакцина бруцеллезная живая; 10 ME — взвесь вакцины, приготовленная по ФСО мутности бактериальных взвесей 10 ME, что соответствует концентрации микробных клеток (м.к.) $1,7 \times 10^9$ м.к./мл; К_ц — контроль цельной вакцины; К — контроль разбавленной вакцины (10 IU); «–» — результаты РА через стандартное оценочное время (2–3 мин) не проявились (только через 30 мин).

* в каждой повторности — 1 образец вакцины и 1 образец сыворотки диагностической поливалентной бруцеллезной в разведении 1:25.

** оценка через 2–3 мин от начала опыта.

*** 0,9% раствор NaCl со взвесью вакцины бруцеллезной живой.

Note. RS, pharmacopoeial reference standard No. 3.2.00396 for live brucellosis vaccine (analyst I); O119 (analyst II) and O120 (analyst III), commercial batches of live brucellosis vaccine; UD, undiluted reconstituted live brucellosis vaccine; 10 IU, vaccine suspension prepared using the pharmacopoeial reference standard (RS) for the bacterial suspension opacity of 10 international opacity units (IU), which corresponds to a microbial concentration of 1.7×10^9 cells/mL; C_{UD}, control, undiluted vaccine; C, control, diluted vaccine (10 IU); –, agglutination appeared only after 30 min, not after the standard evaluation time of 2–3 min.

* Each replicate included 1 sample of live brucellosis vaccine and 1 sample of diagnostic polyvalent brucellosis serum at a dilution of 1:25.

** The result was evaluated after 2–3 min from the beginning of the experiment.

*** This control sample constituted of 0.9% NaCl and suspended live brucellosis vaccine.

Таблица 2. Результаты оценки качества вакцины бруцеллезной живой по показателю «Подлинность» в развернутой реакции агглютинации (в пробирках)**Table 2.** Results of live brucellosis vaccine identification by tube agglutination

Повторность* Replicate*	Визуальная оценка РА** Visual evaluation of agglutination**												Контроль*** Control***
	ФСО RS				O119				O120				
	Титр сыворотки Serum titre												
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800	
1	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	–
2	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	–
3	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	–

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

Примечание. РА — реакция агглютинации; ФСО — фармакопейный стандартный образец ФСО 3.2.00396 вакцины бруцеллезной живой (I аналитик); O119 (II аналитик), O120 (III аналитик) — коммерческие серии вакцины бруцеллезной живой; «–» — отсутствие РА.

* Для РА брали по 1 образцу вакцины бруцеллезной живой и сыворотки диагностической поливалентной бруцеллезной (вакцинный штамм *Brucella abortus* 19 BA).

** Оценка по 4-крестовой схеме: «4+» — крупно- или мелкозернистая агглютинация при полном просветлении надосадочной жидкости, «3+» — легкая опалесценция надосадочной жидкости.

*** 0,9% раствор NaCl со взвесью неразбавленной восстановленной вакцины бруцеллезной живой.

Note. RS, pharmacopoeial reference standard No. 3.2.00396 for live brucellosis vaccine (analyst I); O119 (analyst II) and O120 (analyst III), commercial batches of live brucellosis vaccine; –, no agglutination.

* Experiments included 1 sample of live brucellosis vaccine and 1 sample of diagnostic polyvalent brucellosis serum (*Brucella abortus* 19 BA).

** The test used the standard 4+ agglutination grading system: 4+, coarse or fine agglutination with complete supernatant clarification, 3+, slight supernatant opalescence.

*** This control sample consisted of 0.9% NaCl and suspended undiluted reconstituted live brucellosis vaccine.

На основе полученных результатов можно сделать вывод, что использование РА позволяет подтвердить подлинность *B. abortus* в вакцине бруцеллезной живой.

1.2. Иммуноферментный анализ с применением тест-системы «ИФА-Бру-СтавНИПЧИ». В ходе проведения испытаний вакцины бруцеллезной живой методом ИФА (табл. 3) значения оптической плотности во всех анализах практически совпали с результатами положительного контроля, входящего в набор реагентов «Тест-система диагностическая для выявления возбудителя бруцеллеза в ИФА» (ИФА-Бру-СтавНИПЧИ). Оптическая плотность исследуемых образцов вакцины и положительного контроля в 2 и более раз превышала оптическую плотность отрицательного контроля, что свидетельствует о наличии в образцах бруцеллезного микроба и подтверждает подлинность вакцины бруцеллезной живой. Разные исследуемые концентрации бруцеллезного микроба в вакцине не влияют на значения оптической плотности, поскольку реакция качественная (подтверждает наличие бруцеллезного антигена, а не определяет его концентрацию).

2. Результаты оценки качества вакцины туляреминой живой по показателю «Подлинность» альтернативными методами

2.1. Реакция агглютинации с применением диагностического препарата – сыворотки туляреминой сухой. Как видно из таблицы 4, в случае применения РА для всех образцов вакцины в исследуемой концентрации $5,0 \times 10^9$ м.к./мл были получены положительные результаты. При испытании ФСО вакцины туляреминой живой в титре сыворотки 1:1600 всеми аналитиками наблюдалась крупнозернистая агглютинация при полном просветлении надосадочной жидкости (4 креста), в рабочем разведении сыворотки туляреминой 1:3200 – мелкозернистая агглютинация при легкой опалесценции надосадочной жидкости (3 креста). При испытании кандидата в ФСО вакцины туляреминой живой наблюдалась мелкозернистая агглютинация при легкой опалесценции надосадочной жидкости (3 креста) как в титре сыворотки 1:1600, так и в рабочем разведении 1:3200.

Согласно инструкции по применению сыворотки туляреминой исследуемая культура может быть отнесена к туляреминому микробу, если выявлена положительная РА в разведении не менее 1:1600 при отрицательных контрольных реакциях. В контрольных пробирках (контроль культуры и контроль сыворотки) агглютината и хлопьев не обнаружено. Образец

в контроле сыворотки оставался прозрачным, в контроле взвеси вакцины в исследуемой концентрации $5,0 \times 10^9$ м.к./мл – равномерно мутным. Соответственно, в РА была подтверждена подлинность туляреминого штамма в исследуемом образце вакцины туляреминой живой.

2.2. Метод иммуноферментного анализа с применением тест-системы «ИФА-Тул-СтавНИПЧИ». При испытании вакцины туляреминой живой в ИФА (табл. 5) значения оптической плотности исследуемых образцов вакцины во всех анализах практически совпали с результатами положительного контроля, входящего в набор «Тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии» (ИФА-Тул-СтавНИПЧИ). Оптическая плотность образцов вакцины и положительного контроля в 2 и более раз превышала оптическую плотность отрицательного контроля, что свидетельствует о наличии в образцах туляреминого микроба и подтверждает подлинность вакцины туляреминой живой. Результаты по инактивированной и неинактивированной вакцинам не отличались, следовательно, можно проводить испытания с неинактивированной вакциной. Необходимо отметить, что изменение концентрации туляреминого микроба в вакцине не оказывало значительного влияния на показатели оптической плотности. Реакция была качественной и подтвердила наличие в исследуемых образцах туляреминого антигена.

2.3. Реакция непрямой гемагглютинации с применением набора «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ». В таблице 6 представлены результаты испытания вакцины туляреминой живой в РНГА при помощи набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляреминый иммуноглобулиновый жидкий» (РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ) в сравнении с положительным контролем. Все 3 аналитика наблюдали положительную гемагглютинацию в образцах вакцины с концентрациями $2,5 \times 10^7$, $1,25 \times 10^7$ м.к./мл, а также $6,25 \times 10^6$ м.к./мл (как в положительном контроле набора реагентов). Данные результаты свидетельствуют о наличии в исследуемых образцах туляреминого микроба, что, в свою очередь, подтверждает подлинность вакцины туляреминой живой. Специфичность РНГА была подтверждена постановкой РТНГА. В контрольных лунках был получен отрицательный результат (эритроциты выпали на дно лунки в виде пуговки).

Сравнительный анализ альтернативных методов в оценке качества вакцин

Результаты проведенных сравнительных серологических исследований (испытаний)

Таблица 3. Результаты оценки качества вакцины бруцеллезной живой по показателю «Подлинность» методом иммуноферментного анализа
Table 3. Results of live brucellosis vaccine identification by immunoenzyme assay

Оптическая плотность образцов, опт. ед. <i>Optical density of samples, optical density units</i>															
Образец вакцины <i>Vaccine sample</i>	ФСО <i>RS</i>		O119				O120				K+ <i>C+</i>		K- <i>C-</i>		
	Повторность <i>Replicate</i>														
	$X_{\text{ф}} \pm 2S$ $X_{\text{mean}} \pm 2S$		1		2		$X_{\text{ф}} \pm 2S$ $X_{\text{mean}} \pm 2S$		1		2		$X_{\text{ф}} \pm 2S$ $X_{\text{mean}} \pm 2S$		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	$X_{\text{ф}} \pm 2S$ $X_{\text{mean}} \pm 2S$
A	0,126	0,113	0,125±0,014 (3,470 от K- / relative to C-)		0,112	0,131	0,124±0,014 (3,450 от K- / relative to C-)		0,121	0,134	0,128±0,009 (3,600 от K- / relative to C-)		0,036	0,034	$X_{\text{ф}} \pm 2S$ $X_{\text{mean}} \pm 2S$
	0,132	0,130			0,122	0,129			0,127	0,128			0,038	0,035	
B	0,121	0,114	0,122±0,006 (3,400 от K- / relative to C-)		0,133	0,128	0,127±0,013 (3,500 от K- / relative to C-)		0,127	0,134	0,132±0,012 (3,700 от K- / relative to C-)		-	-	0,036±0,003
	0,126	0,126			0,130	0,115			0,136	0,132			-	-	
C	0,134	0,122	0,127±0,008 (3,500 от K- / relative to C-)		0,130	0,113	0,123±0,011 (3,400 от K- / relative to C-)		0,109	0,110	0,117±0,013 (3,300 от K- / relative to C-)		-	-	
	0,127	0,124			0,125	0,123			0,123	0,125			-	-	

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

Примечание. ФСО – фармакопейный стандартный образец ФСО 3.2.00396 вакцины бруцеллезной живой; O119, O120 – коммерческие серии вакцины бруцеллезной живой (вакциный штамм *Brucella abortus* 19 BA); K+ – положительный контроль со взвесью инактивированной культуры *B. abortus* 19 BA из диагностической тест-системы; X_ф – среднее значение показателя по объединенной выборке, 2S – два стандартных отклонения результатов испытаний; A – разведенная вакцина концентрацией 1,0×10⁹ м.к./мл (как в положительном контроле); B – вакцина разведенная концентрацией 1,7×10⁹ м.к./мл (по ФСО мутности бактериальных взвесей 10 ME); C – образцы вакцин цельных восстановленных концентрацией: ФСО – 5,5×10¹⁰ м.к./мл, O119 – 7,0×10¹⁰ м.к./мл, O120 – 5,8×10¹⁰ м.к./мл.

«-» – различия в результатах контролей (из набора тест-системы) ничтожно малы и статистические незначимы, поэтому считали результатами одинаковыми для всех опытов (данные представлены в верхних ячейках) со всеми образцами вакцины бруцеллезной живой.

Note. RS, pharmacopoeial reference standard No. 3.2.00396 for live brucellosis vaccine; O119 and O120, commercial batches of live brucellosis vaccine (*Brucella abortus* 19 BA); C+, positive control, suspended inactivated *B. abortus* 19 BA culture from the diagnostic test kit at a concentration of 1.0×10⁹ cells/mL; C-, negative control, working solutions from the diagnostic test kit; X_{mean} – mean value for the combined sample; S, standard deviation for the test results; A, diluted vaccine at a concentration of 1.0×10⁹ cells/mL (at the same concentration as positive control samples); B, diluted vaccine at a concentration of 1.7×10⁹ cells/mL (according to the pharmacopoeial RS for bacterial suspension opacity of 10 IU); C, undiluted vaccine at concentrations of 5.5×10¹⁰ cells/mL (RS No. 3.2.00396), 7.0×10¹⁰ cells/mL (O119), and 5.8×10¹⁰ cells/mL (O120).

– Since the difference between the control (test kit) results was negligible and statistically insignificant, the results of all experiments with live brucellosis vaccine samples were considered virtually the same (see the upper cell of the corresponding column).

Таблица 4. Результаты оценки качества вакцины туляреминой живой по показателю «Подлинность» в развернутой реакции агглютинации

Table 4. Results of live tularaemia vaccine identification by tube agglutination

Образец Sample	Повторность* Replicate*	Визуальная оценка РА** Visual evaluation of agglutination**											
		ФСО RS						Кандидат в ФСО Candidate RS					
		Титр сыворотки Serum titre											
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
I	1	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	2	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	3	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	3+	3+
II	1	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	2	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	3	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	3+	3+
III	1	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	2	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	3+	3+
	3	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	3+	3+

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

Примечание. ФСО – фармакопейный стандартный образец вакцины туляреминой живой ФСО 3.2.00398 (ОСО 42-28-398) серии 011-011222; кандидат в ФСО – кандидат в ФСО вакцины туляреминой живой ФСО 3.2.00398 серии 012; РА – реакция агглютинации.

* постановка РА: по 1 образцу вакцины туляреминой живой и сыворотки диагностической туляреминой сухой.

** оценка по 4-крестовой схеме: 4+ (4 креста) – крупно- или мелкозернистая агглютинация при полном просветлении надосадочной жидкости, 3+ (3 креста) – легкая опалесценция надосадочной жидкости.

Note. RS, pharmacopoeial reference standard No. 3.2.00398 for live tularaemia vaccine (industry reference material No. 42-28-398), batch 011-011222; candidate RS, candidate pharmacopoeial RS No. 3.2.00398 for live tularaemia vaccine, batch 012.

* Agglutination experiments included 1 sample of live tularaemia vaccine and 1 sample of dry diagnostic tularaemia serum.

** The test used the standard 4+ agglutination grading system: 4+, coarse or fine agglutination with complete supernatant clarification, 3+, slight supernatant opalescence.

альтернативными методами – РА, РНГА, ИФА – показали принципиальную возможность применения данных методов для определения показателя «Подлинность» вакцины бруцеллезной живой и вакцины туляреминой живой, причем с использованием коммерческих тест-систем и диагностических препаратов отечественного производства. Однако анализ полученных результатов не позволяет рекомендовать ИФА для определения показателя «Подлинность» указанных вакцин, так как данный метод трудоемок и менее экономичен, чем РА. Для проведения ИФА требовалось приготовление большого количество рабочих растворов, дополнительная сенсibilизация и инкубирование планшетов, использование считывающего оборудования. Метод ИФА более удобен для применения в лабораторной диагностике для идентификации туляреминого и бруцеллезного микробов в биологическом и клиническом материале,

исследования объектов внешней среды, так как одновременно позволяет тестировать 46 образцов, подозрительных на содержание *F. tularensis* и *B. abortus*.

Метод РНГА менее удобен, информативен и экономичен, чем РА, поэтому его применение более целесообразно в лабораторной диагностике туляреминого микроба, так как одновременно позволяет исследовать до 100 образцов, подозрительных на содержание *F. tularensis*.

Результаты экспериментов позволяют сделать вывод, что РА может быть оптимальным альтернативным методом испытания по показателю «Подлинность» вакцины бруцеллезной живой и вакцины туляреминой живой. Основные преимущества данного метода:

1) простота и удобство применения без использования дополнительного оборудования и трудоемкой пробоподготовки, экономия времени;

Таблица 5. Результаты оценки качества вакцины туляреминой живой по показателю «Подлинность» методом иммуноферментного анализа
Table 5. Results of live tularemia vaccine identification by immunoenzyme assay

Концентрация вакцины, м.к./мл <i>Vaccine concentration, cells/mL</i>	Тип вакцины <i>Vaccine type</i>	Оптическая плотность образцов, опт. ед. <i>Optical density of samples, optical density units</i>													
		ФСО <i>RS</i>			Кандидат в ФСО <i>Candidate RS</i>			К+ <i>C+</i>			К- <i>C-</i>				
		Повторность <i>Replicate</i>													
		1	2	3	$X_{cp} \pm 2S$ X_{mean}	1	2	3	$X_{cp} \pm 2S$ X_{mean}	1	2	$X_{cp} \pm 2S$ X_{mean}	1	2	$X_{cp} \pm 2S$ X_{mean}
1×10 ⁹	И <i>NA</i>	2,298	2,283	2,112	2,133±0,273 (25,1 от К- / relative to C-)	1,871	1,872	1,903	1,933±0,129 (22,7 от К- / relative to C-)	1,903	1,966	1,942±0,056	0,086	0,084	0,086±0,013
		2,127	2,010	1,966		2,036	1,945	1,971							
	НИ <i>A</i>	2,189	2,186	2,172	2,080±0,246 (23,6 от К- / relative to C-)	2,047	2,025	1,867	1,978±0,160 (22,5 от К- / relative to C-)	1,921	1,976	1,949±0,078	0,097	0,078	0,088±0,027
		1,966	2,065	1,905		1,898	2,058	1,975							
10 ME (5×10 ⁹) 10 IU (5×10 ⁹)	И <i>NA</i>	2,225	2,176	2,313	2,067±0,405 (24,3 от К- / relative to C-)	2,051	2,059	2,199	1,973±0,306 (23,2 от К- / relative to C-)	-	-	-	-	-	-
		2,013	1,829	1,848		1,883	1,821	1,827							
	НИ <i>A</i>	2,216	2,150	2,207	2,068±0,274 (23,5 от К- / relative to C-)	2,280	2,064	2,158	2,050±0,318 (23,3 от К- / relative to C-)	-	-	-	-	-	-
		1,967	1,936	1,934		1,969	2,007	1,819							

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

Примечание. ФСО – фармакопейный стандартный образец вакцины туляреминой живой ФСО 3.2.00398 (ОСО 42-28-398) серии 011-011222 (3 повторности); К+ – положительный контроль (взвесь инaktivированной культуры *Francisella tularensis* из набора тест-системы, концентрация микробных клеток (м.к.) на 1 мл вакцины 1,0×10⁹ м.к./мл; К- – отрицательный контроль (рабочие растворы тест-системы); тип вакцины туляреминой живой: И – инaktivированные (по 2 аналитика); НИ – неинaktivированные (по 2 аналитика); X_ф – среднее значение показателя по объединенной выборке, 2S – два стандартных отклонения результатов испытаний.

«-» – различия в результатах контролей (из набора тест-системы) ничтожно малы и статистические незначимы, поэтому считали результаты одинаковыми для всех опытов (данные представлены в верхних ячейках) со всеми образцами вакцины туляреминой живой.

Note. RS, pharmacopoeial reference standard No. 3.2.00398 for live tularemia vaccine (industry reference material No. 42-28-398), batch 011-011222 (3 replicates); C+, positive control, suspended inactivated *Francisella tularensis* culture from the diagnostic test kit at a concentration of 1.0×10⁹ cells/mL; C-, negative control, working solutions from the diagnostic test kit; NA, inactivated vaccine (2 analysts); A, not inactivated vaccine (2 analysts); X_{mean} mean value for the combined sample; S, standard deviation for the test results.

- Since the difference between the control (test kit) results was negligible and statistically insignificant, the results of all experiments with live brucellosis vaccine samples were considered virtually the same (see the upper cell of the corresponding column).

Таблица 6. Результаты оценки качества вакцины туляремиальной живой по показателю «Подлинность» в реакции непрямой гемагглютинации (микрометодом)
Table 6. Results of live tularaemia vaccine identification by micro-indirect haemagglutination

Аналитик <i>Analyst</i>	Повтор- ность, <i>a/b</i> <i>Replicate, a/b</i>	Визуальная оценка РНГА* <i>Visual evaluation of indirect haemagglutination*</i>							
		ФСО <i>RS</i>				Кандидат в ФСО <i>Candidate RS</i>			
		Концентрация вакцины, м.к./мл <i>Vaccine concentration, cells/mL</i>			К– <i>C–</i>	Концентрация вакцины, м.к./мл <i>Vaccine concentration, cells/mL</i>			К– <i>C–</i>
		2,5×10 ⁷	1,25×10 ⁷	6,25×10 ⁶		2,5×10 ⁷	1,25×10 ⁷	6,25×10 ⁶	
I	1/1	+	+	+	–	+	+	+	–
	1/2	+	+	+	–	+	+	+	–
	2/1	+	+	+	–	+	+	+	–
	2/2	+	+	+	–	+	+	+	–
II	1/1	+	+	+	–	+	+	+	–
	1/2	+	+	+	–	+	+	+	–
	2/1	+	+	+	–	+	+	+	–
	2/2	+	+	+	–	+	+	+	–
III	1/1	+	+	+	–	+	+	+	–
	1/2	+	+	+	–	+	+	+	–
	2/1	+	+	+	–	+	+	+	–
	2/2	+	+	+	–	+	+	+	–
К+ <i>C+</i>	1	+	+	+	Не приме- нимо <i>N/A</i>	+	+	+	Не приме- нимо <i>N/A</i>
	2	+	+	+		+	+	+	

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

Примечание. *a* – номер образца вакцины; *b* – номер опыта; РНГА – реакция непрямой агглютинации (микрометод); ФСО – фармакопейный стандартный образец ФСО 3.2.00398 вакцины туляремиальной живой; К– – отрицательный контроль (разводящая жидкость из набора); К+ – взвесь инактивированной культуры туляремиального микроба (вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ) с концентрацией микробных клеток (м.к.) 1,0×10⁹ м.к./мл.
* Критерии оценки: «+» – положительный результат РНГА: эритроциты выпадают на дно лунок равномерным слоем в виде зонтика, занимая не менее 2/3 диаметра сферической поверхности в лунке (в ряде случаев – фестончатое оплывание краев агглютината); «–» – отрицательный результат РНГА: эритроциты выпадают на дно лунки в виде пуговки или узкого колечка с ровным краем.
Note. *a*, vaccine sample number; *b*, experiment number; RS, pharmacopoeial reference standard No. 3.2.00398 for live tularaemia vaccine; C–, negative control (diluent from the kit); C+, suspended inactivated culture of tularaemia microbe (*Francisella tularensis* 15 NIIEG) at a concentration of 1.0×10⁹ cells/mL; N/A, not applicable.
* Evaluation criteria: +, positive result with erythrocytes settling to the bottom of the wells as a uniform umbrella-like mat occupying at least 2/3 of the spherical well surface (in some cases, the edges can be scalloped); –, negative result with erythrocytes settling to the bottom of the wells as a button or a narrow ring with smooth edges.

- 2) специфичность метода, обеспечивающая получение достоверных результатов;
- 3) экономичность – невысокая цена, длительный срок годности диагностического препарата (5 лет – для сыворотки туляремиальной, 3 года – для сыворотки бруцеллезной).

Выводы

- 1. Результаты проведенных серологических испытаний с использованием метода иммуноферментного анализа, реакции агглютинации
- 2. Реакция агглютинации на стекле или при развернутой постановке (в пробирках) с использованием диагностического препарата – сы-

и реакции непрямой гемагглютинации показали принципиальную возможность применения этих альтернативных методов для оценки качества вакцины бруцеллезной живой и вакцины туляремиальной живой по показателю «Подлинность» и, что особенно важно в современных условиях, с применением российских диагностических препаратов.

воротки поливалентной бруцеллезной сухой, а также реакция агглютинации с развернутой постановкой с применением сыворотки диагностической туляреминой сухой позволяют упростить испытания по показателю «Подлинность» без потери качества и могут служить эффективными альтернативными методами оценки качества вакцин.

3. Применение методов иммуноферментного анализа и реакции непрямой гемагглютинации по сравнению с реакцией агглютинации менее предпочтительно по причине их неэко-

номичности и трудоемкости. Рекомендовать их для оценки качества по показателю «Подлинность» как вакцины бруцеллезной живой, так и вакцины туляреминой живой в настоящее время нецелесообразно.

4. Метод реакции агглютинации может быть рекомендован для внесения в требования нормативных документов на вакцину бруцеллезную живую и вакцину туляреминую живую в качестве альтернативного метода при проведении оценки качества вакцин по показателю «Подлинность».

Литература/References

1. Касина ИВ, Алексеева СА, Бердникова ЗЕ, Немировская ТИ, Алехина АС. Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины туляреминой живой. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(4):240–7. Kasina IV, Alekseeva SA, Berdnikova ZE, Nemirovskaya TI, Alekhina AS. Prospects for improving evaluation of live tularemia vaccine quality. *BIO-preparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(4):240–7 (In Russ.). EDN: [ZXGLLX](#)
2. Онищенко ГГ, Кутырев ВВ, ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство*. М.: ЗАО «Шико»; 2013. Onishchenko GG, Kutyrev VV, eds. *Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases. Practical guide*. Moscow: Shiko; 2013 (In Russ.). EDN: [SHFBUN](#)
3. Шепелин ИА, Миронов АЮ, Шепелин КА. *Возбудители особо опасных бактериальных инфекций. Справочник бактериолога*. М.: ЗАО «А-Принт»; 2016. Shepelin IA, Mironov AYU, Shepelin KA. *Pathogens of especially dangerous bacterial infections. Reference book of a bacteriologist*. Moscow; 2016 (In Russ.). EDN: [WJXGZ](#)
4. Андреевская НМ, Михайлова ВА, Каретникова ЭС, Атлас АГ, Михайлов ЛМ, Калиновский АИ и др. Изучение и испытание экспериментально-производственных серий поливалентной бруцеллезной сыворотки. *Acta Biomedica Scientifica*. 2012;5(1):187–9. Andreevskaya NM, Mikhailova VA, Karetnikova ES, Atlas AG, Mikhailov LM, Kalinovskiy AI, et al. Examination and testing of experimental-production series of polyvalent brucellosis serum. *Acta Biomedica Scientifica*. 2012;5(1):187–9 (In Russ.). EDN: [PIWDND](#)
5. Аракелян ПК, Разницына ГВ, Димов СК, Гаус НФ. Способ изготовления бруцеллезной диагностической сыворотки. Патент Российской Федерации № 2549434; 2015. Arakeljan PK, Raznitsyna GV, Dimov SK, Gaus NF. Method for making brucellosis diagnostic serum. Patent of the Russian Federation No 2549434; 2015 (In Russ.). EDN: [WAEEMY](#)
6. Курчева СА, Тюменцева ИС, Афанасьев ЕН, Жданова ЕВ, Старцева ОЛ, Жарникова ИВ и др. Разработка диагностической тест-системы для выявления специфических антител к возбудителю бруцеллеза в непрямом методе иммуноферментного анализа. *Современные проблемы науки и образования*. 2016;(2):e64. Kurcheva SA, Tyumentseva IS, Afanasiev EN, Zhdanova EV, Startseva OL, Zharnikova IV, et al. Development of diagnostic test system for detection of specific antibodies to pathogens brucellosis in indirect method of enzyme immunoassay. *Modern Problems of Science and Education*. 2016;(2):e64 (In Russ.). EDN: [YUCUXD](#)
7. Еремкин АВ, Елагин ГД, Печенкин ДВ, Фоменков ОО, Богачева НВ, Кытманов АА и др. Разработка иммуноферментной и иммунохроматографической моноклональных тест-систем для выявления возбудителя туляремии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;61(3):184–7. Eremkin AV, Elagin GD, Pechenkin DV, Fomenkov OO, Bogatcheva NV, Kytmanov AA, et al. The development of immune enzyme immune chromatographic monoclonal test-systems for detecting tularemia agent. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2016;61(3):184–7 (In Russ.). EDN: [VXLOFZ](#)
8. Губарева ТИ, Уланова ГИ. Анализ эффективности применения методов лабораторного исследования на природно-очаговые инфекции. В кн.: *Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней. VI сборник научных работ*. Ижевск; 2018. С. 26–8. Gubareva TI, Ulanova GI. Analysis of the effectiveness of laboratory methods for especially dangerous infections. In: *The most important issues of infectious and parasitic diseases. 6th collection of scientific works*. Izhevsk; 2018. P. 26–8 (In Russ.). EDN: [YYQXRR](#)
9. Жарникова ИВ, Курчева СА, Русанова ДВ, Жарникова ТВ. Аналитические характеристики диагностических препаратов для иммуноанализа особо опасных инфекций. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2020;16(3):36–42. Zharnikova IV, Kurcheva SA, Rusanova DV, Zharnikova IV, Kurcheva SA, Rusanova DV, Zharnikova

va TV. Analytical characteristics of diagnostic preparation for immunoassay of particularly dangerous infections. *Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2020;16(3):36–42 (In Russ.).

EDN: [NMWSEM](#)

10. Кретенчук ОФ. Отечественные средства диагностики особо опасных инфекций на основе мо-

ноклональных антител. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(4):35–45.

Kretenchuk OF. Domestically-produced monoclonal-antibody-based means of diagnosing particularly dangerous infections. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(4):35–45 (In Russ.).

<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-4-35-45>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.В. Касина** — разработка дизайна и концепции экспериментального исследования, теоретическое обоснование и экспериментальная работа по оценке качества вакцины по показателю «Подлинность» вакцины туляремийной живой, обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов исследования, написание и критический пересмотр текста рукописи; **С.А. Алексеева** — экспериментальная работа по оценке качества вакцины по показателю «Подлинность» вакцины бруцеллезной живой, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста рукописи; **Т.И. Немировская** — общее руководство, критический анализ 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. **I.V. Kasina** conceptualised and designed the study, provided a theoretical justification for the study, conducted identification experiments for the live tularemia vaccine, summarised experimental data, analysed and interpreted the study results, drafted and critically revised the manuscript. **S.A. Alekseeva** conducted identification experiments for the live brucellosis vaccine, analysed and interpreted the study results, and drafted the manuscript. **T.I. Nemirovskaya** provided general guidance, critically revised the manuscript, and approved the final version for publication.

Об авторах / Authors

Касина Ирина Владимировна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3287-2631>

kasina@expmed.ru

Алексеева Светлана Александровна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5804-5709>

alekseevas@expmed.ru

Немировская Татьяна Ивановна, канд. мед. наук

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

nemirovskaya@expmed.ru

Irina V. Kasina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3287-2631>

kasina@expmed.ru

Svetlana A. Alekseeva, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5804-5709>

alekseevas@expmed.ru

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

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

nemirovskaya@expmed.ru

Поступила 08.08.2023

После доработки 06.02.2024

Принята к публикации 29.02.2024

Received 8 August 2023

Revised 6 February 2024

Accepted 29 February 2024



Анализ качества вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря с помощью контрольных карт Шухарта

А.А. Савина , А.А. Воропаев, А.А. Алесина

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

 Савина Анна Александровна; Savina@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ. Сложность стандартизации иммунобиологических лекарственных препаратов, в том числе вакцины БЦЖ, обуславливает необходимость совершенствования статистического подхода к анализу стабильности показателей качества препарата. Одним из инструментов анализа качества являются контрольные карты Шухарта (ККШ), использование которых позволяет выявлять и анализировать тренды изучаемых процессов как в режиме реального времени, так и ретроспективно.

ЦЕЛЬ. Оценка показателей качества вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря с применением контрольных карт Шухарта для мониторинга стабильности процессов производства и проведения испытаний по показателям качества.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Проведен ретроспективный анализ результатов контроля препарата Имурон-вак (Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря) за 5 лет по количественным показателям качества: «Общее содержание бактерий», «Дисперсность», «Потеря в массе при высушивании» и «Специфическая активность». Проведена статистическая обработка данных: расчет среднего значения, оценка наличия корреляции между результатами анализа показателей качества предприятия-производителя и испытательного центра, проверка нормальности распределения, построены и проанализированы контрольные карты индивидуальных значений и скользящих размахов по каждому показателю.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Значение коэффициента корреляции (r) при анализе данных производителя и ИЦ составило от 0,34 до 0,70. Проверка данных испытательного центра с помощью критерия согласия Пирсона выявила нормальное распределение для показателей качества: «Дисперсность» ($\chi^2=14,03$) и «Потеря в массе при высушивании» ($\chi^2=4,93$). При анализе ККШ по показателям качества «Потеря в массе при высушивании» и «Специфическая активность» были обнаружены признаки выхода процесса производства и/или процесса проведения испытания при оценке качества из состояния статистической управляемости. При мониторинге показателей качества «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность» выявлено, что было достигнуто состояние статистической управляемости. Определены контрольные границы для дальнейшего мониторинга стабильности результатов по показателю «Дисперсность» в реальном времени.

ВЫВОДЫ. Подтверждена применимость ККШ для оценки качества вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря при проведении контроля в испытательном центре. Показана необходимость внедрения постоянного мониторинга стабильности показателей качества для повышения стандартизации процессов при производстве вакцины и методик проведения испытаний, что позволит обеспечить высокий уровень выпускаемой продукции.

Ключевые слова: анализ качества; вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря; Имурон-вак; контрольные карты Шухарта; стабильность показателей качества; контроль качества; мониторинг стабильности производственного процесса

Для цитирования: Савина А.А., Воропаев А.А., Алесина А.А. Анализ качества вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря с помощью контрольных карт Шухарта. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):76–90. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-76-90>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).

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

Quality analysis of BCG vaccine for bladder cancer immunotherapy using Shewhart control charts

Anna A. Savina , Andrey A. Voropaev, Anna A. Alesina

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

 Anna A. Savina; Savina@expmed.ru

ABSTRACT

SCIENTIFIC RELEVANCE. The complexity of standardising immunobiologicals, including bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccines, requires improving the approach to statistical analysis of consistency in their quality indicators. Quality analysis tools include Shewhart control charts, which can be used for real-time and retrospective identification and analysis of trends in the processes of interest.

AIM. This study aimed to analyse quality indicators of a BCG vaccine for bladder cancer immunotherapy using Shewhart control charts to monitor consistency in manufacturing processes and quality testing of vaccines.

MATERIALS AND METHODS. The study involved a retrospective analysis of the bacterial concentration, dispersity index, loss-on-drying, and potency data obtained during the quality control of Imuron-vac, a BCG vaccine for bladder cancer immunotherapy, in the past 5 years. As part of the statistical data analysis, the authors calculated the means, investigated the correlation between the test results provided by the manufacturer and the quality control results obtained at the testing centre (TC), and checked the distributions for normality. Individuals and moving range control charts were plotted and analysed for each quality indicator.

RESULTS. The correlation coefficients (r) ranged from 0.34 to 0.70 for the data submitted by the manufacturer and the data obtained at the TC. Pearson's goodness-of-fit test showed that the distribution of the quality control results obtained at the TC was normal, with $\chi^2 = 14.03$ for the dispersity index values and $\chi^2 = 4.93$ for the loss-on-drying measurements. Shewhart control charts for loss-on-drying and potency data suggested that the production process and/or the testing process deviated from the state of statistical control. Consistency monitoring of the bacterial concentration and the dispersity index showed that the state of statistical control was achieved. The authors established control limits for further real-time monitoring of the dispersity index consistency.

CONCLUSIONS. Shewhart control charts are applicable to the quality control of BCG vaccines for bladder cancer immunotherapy at the TC. Continuous monitoring of consistency in quality indicators is needed to improve the standardisation of vaccine production processes and testing methods, as this standardisation will result in high product quality.

Keywords: quality analysis; BCG vaccine for bladder cancer immunotherapy; Imuron-vac; Shewhart control charts; consistency of quality indicators; quality control; monitoring of the production process stability

For citation: Savina A.A., Voropaev A.A., Alesina A.A. Quality analysis of BCG vaccine for bladder cancer immunotherapy using Shewhart control charts. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):76–90. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-76-90>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00026-24-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D reporting No. 124022200103-5).

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

Введение

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на 2024 г. рак мочевого пузыря входит в десять наиболее распространенных в мире онкологических заболеваний¹. Основной причиной неблагоприятных исходов при немышечно-инвазивном раке мочевого пузыря является высокая частота развития рецидивов заболевания после хирургического лечения. Риск рецидива может составлять до 70% [1]. Иммунотерапия с применением вакцины БЦЖ является эффективным способом лечения рака мочевого пузыря [2]. Проведенные исследования в течение 40 лет использования вакцины БЦЖ при немышечно-инвазивном раке мочевого пузыря показали, что БЦЖ-терапия приводит к снижению рисков развития рецидива и прогрессирования заболевания и имеет преимущество перед применением внутривезикулярной химиотерапии [2].

Впервые проведение иммунотерапии на основе живого аттенуированного штамма *Mycobacterium bovis* BCG Frappier при раке мочевого пузыря было предложено в 1976 г. в исследовании А. Morales и соавт. [3]. Изучение механизма противоопухолевого действия БЦЖ-вакцины показало, что микобактерии, входящие в состав вакцины, индуцируют активацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, NK-клеток, макрофагов, дендритных клеток, а также секрецию ряда цитокинов (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18), фактора некроза опухоли (TNF-α), интерферона-γ (IFN-γ), опосредующих местный противоопухолевый иммунный ответ. Как адаптивный, так и врожденный иммунный ответ имеет решающее значение в терапии БЦЖ. Однако механизм противоопухолевого ответа на введение БЦЖ до конца не ясен и, вероятно, является многофакторным [4, 5].

В настоящее время для лечения рака мочевого пузыря в Российской Федерации разрешен к применению отечественный препарат Имулон-вак (Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря)², выпускаемый ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (филиал

«Медгамал»). Препарат представляет собой микобактерии вакцинного штамма *Mycobacterium bovis* субштамм BCG-1 (Russia), лиофилизированные в 1,5% растворе глутамата натрия³.

Требования к показателям качества препарата изложены в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд.⁴ (ГФ РФ XIV). Мониторинг стабильности показателей качества лекарственных препаратов — важный компонент системы управления производственным процессом. Контроль качества иммунобиологических лекарственных препаратов является основополагающим условием для обеспечения безопасности и эффективности выпускаемой продукции. Каждый производственный или технологический процесс обладает определенной изменчивостью вследствие действия на него множества факторов: вариативность исходных реактивов и материалов, оборудования, методик выполнения работ и проведения испытаний, навыков персонала. В силу этого результаты процесса — продукция и характеристики ее качества — обладают определенной степенью вариации, но в рамках допустимых пределов [6]. Принимая во внимание сложность стандартизации иммунобиологических лекарственных препаратов, в том числе вакцины БЦЖ, актуальной задачей является разработка системного статистического подхода к анализу показателей качества препарата вакцины при проведении мониторинга стабильности производственного процесса. Основная задача статистического управления процессом состоит в недопущении отклонений параметров от установленных стандартов, а также в своевременном обнаружении подобных отклонений [7].

Одним из инструментов оценки стабильности и анализа показателей производственного процесса являются контрольные карты Шухарта (ККШ), использование которых позволяет выявлять и анализировать тренды изучаемых процессов как в режиме реального времени, так и ретроспективно. В Российской Федерации метод описан в стандартах ГОСТ Р ИСО 7870-1-2022 и ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015⁵. Контрольные карты — простой и эффективный стандартизированный статистический инструмент для контроля

¹ <https://gco.iarc.fr/today/home>

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

³ Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция по медицинскому применению препарата Имулон-вак (Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря). https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=-2c603cdb-8b61-4ae5-b196-689e5e8ee3ef

⁴ ФС.3.3.1.0053.18 Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁵ ГОСТ Р ИСО 7870-1-2022. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 1. Общие принципы.

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

изменчивости и управления технологическими процессами. Метод позволяет получать достоверные данные о процессе, выявлять сбои, проводить корректировку для достижения статистически управляемого состояния [7, 8]. В фармацевтической промышленности качество и безопасность продуктов играют решающую роль, поэтому применение контрольных карт является неотъемлемой частью стратегии обеспечения высокого качества выпускаемой продукции. Они предоставляют необходимые инструменты для мониторинга и контроля производственных процессов, которые позволяют своевременно идентифицировать негативные тенденции и риски для качества производимых фармацевтических препаратов, что способствует принятию наиболее правильных решений [9, 10].

ККШ используют в том числе для оценки стабильности производства вакцин. Их применение обеспечивает возможность эффективной оценки данных при подтверждении соответствия характеристик лекарственных препаратов требованиям нормативной документации (НД) [11]. В соответствии с ГОСТ ISO/IEC 17025-2019⁶ установлено требование использования статистических методов для мониторинга и контроля процессов в испытательных лабораториях. При этом статистические подходы не конкретизированы, поэтому вполне допустимо применение лабораториями для более точного контроля процессов измерения таких инструментов, как ККШ.

Цель работы – оценка показателей качества вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря с применением контрольных карт Шухарта для мониторинга стабильности процессов производства и проведения испытаний по показателям качества.

Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

- определить показатели качества вакцины для иммунотерапии рака мочевого пузыря, которые можно использовать для статистического контроля с помощью ККШ;
- систематизировать результаты анализа показателей качества вакцины за 2019–2023 гг. согласно данным предприятия-производителя и испытательного центра и построить на их основе ККШ;
- оценить эффективность применимости использования ККШ при мониторинге качества вакцины.

Материалы и методы

Материалы

Образцы препарата Имурон-вак (Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря), лиофилизат для приготовления суспензии для внутрипузырного введения, 8–15 млн/мг, 50 мг во флаконе, производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (филиал «Медгамал»); 138 коммерческих серий 2019–2023 гг. выпуска, поступивших в Испытательный центр (ИЦ) экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России для подтверждения соответствия показателей качества препарата требованиям нормативной документации (НД).

Оборудование

Для проведения испытаний использовали оборудование с действительным свидетельством о поверке (аттестации): шкаф ламинарный II класса биологической защиты NU-425-500E (NuAire Inc., США); термостат-инкубатор с естественной конвекцией BD240 (Binder GmbH, Германия); колориметр фотоэлектрический КФК-3 (ОАО «ЗОМЗ», Россия); весы аналитические специальные 1-го класса точности ВР 221S (ООО «Сартогосм», Россия); термостат ТС-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия); дозаторы механические одноканальные 20–200 и 500–5000 мкл (Biohit, Sartorius, Финляндия).

Методы

При ретроспективном анализе были использованы данные испытаний вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря согласно результатам, предоставленным предприятием-производителем, и результатам, полученным при контроле качества в ИЦ. Испытания по показателям качества проводились в соответствии с методиками, описанными в ГФ РФ XIV⁷ и в НД производителя.

Общее содержание бактерий. Показатель определяли фотометрическим методом в соответствии с требованиями ФС.3.3.1.0053.18⁸. Препарат восстанавливали до содержания 1 мг/мл микробных клеток БЦЖ путем добавления во флакон 0,9% раствора натрия хлорида. Определяли оптическую плотность (ОП) восстановленного препарата при длине волны 490 нм.

⁶ ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

⁷ ФС.3.3.1.0053.18 Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁸ Там же.

Контролем служил стерильный 0,9% раствор натрия хлорида.

Дисперсность. Испытание проводили совместно с определением общего содержания бактерий фотометрическим методом по методике, изложенной в нормативной документации на препарат⁹. ОП раствора образца измеряли при 440 и 670 нм, показатель дисперсности (n) вычисляли по формуле (1):

$$n = \frac{\lg D_1/D_2}{K}, \quad (1)$$

где D_1, D_2 , — ОП при длине волны λ_1 и λ_2 , K — постоянный множитель.

Специфическая активность. Для оценки показателя согласно требованиям ФС.3.3.1.0053.18¹⁰ проводили определение числа жизнеспособных клеток БЦЖ в 1 мг вакцины методом посева восстановленного препарата на плотную питательную среду Левенштейна — Йенсена с последующим инкубированием в течение 28 сут при 37 °С и подсчетом выросших колоний.

Потеря в массе при высушивании. Показатель определяли гравиметрическим методом в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0010.15¹¹.

Статистическую обработку данных проводили, рассчитывая среднее значение, стандартное отклонение, коэффициент корреляции, с использованием программы Microsoft Office Excel 2007.

Построение контрольных карт Шухарта. ККШ строили на основе данных, полученных в ИЦ в ходе проведения испытаний на соответствие требованиям НД. Были построены и проанализированы два типа ККШ: карты скользящих размахов (R-карта) и карты индивидуальных значений (X-карта). Величину скользящих размахов (R) определяли как разность между двумя последовательными значениями. Значения размахов и индивидуальные значения откладывали на X- и R-картах на оси ординат в зависимости от номеров серий препарата, которые были отмечены по оси абсцисс в хронологическом порядке. На каждой контрольной карте отмечали центральную линию (CL), верхнюю (UCL) и нижнюю контрольную границы (LCL). Эти границы были рассчитаны с учетом R. Полученные результаты были интерпретированы в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015¹².

Результаты и обсуждение

Обоснование выбора показателей качества вакцины

При выборе анализируемых показателей качества вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря (табл. 1) предпочтительным было использование показателей, имеющих количественный тип данных, поскольку они являются информативными и позволяют проводить анализ, отслеживать состояние процесса во времени и, главное, воздействовать на процесс до того, как он выйдет из-под контроля. Поэтому для исследования были отобраны показатели качества, имеющие числовые значения: «Общее содержание бактерий», «Дисперсность», «Потеря в массе при высушивании» и «Специфическая активность».

Сравнительный анализ значений показателей качества вакцины

Результаты испытаний по выбранным показателям качества вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря согласно данным предприятия-производителя и ИЦ представлены в таблице 2. Средние значения показателей и значения стандартных отклонений результатов полностью совпали для показателей качества «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность», небольшие различия были определены для показателя «Специфическая активность». При посерийном анализе была выявлена выраженная корреляционная связь для всех показателей, кроме показателя «Общее содержание бактерий», для которого характерна умеренная связь ($r=0,34$).

Стоит отметить значительные различия между результатами испытаний предприятия-производителя и ИЦ по показателю «Потеря в массе при высушивании» при заметной корреляционной связи. Возможные причины получения таких данных: недостаточная стандартизация процесса лиофилизации и определения показателя «Потеря в массе при высушивании». Сложность оценки данного показателя обусловлена особенностями процесса высушивания, при котором наблюдается так называемый «эффект краевого флакона». Данный эффект объясняется неравномерной передачей тепла в камере лиофильной сушки — крайние флаконы получают тепло и от полки камеры, и от стенок

⁹ Нормативная документация НД Р N001970/01-120722 Имунрон-вак (Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря).

¹⁰ ФС.3.3.1.0053.18 Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

¹¹ ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹² ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

Таблица 1. Показатели качества вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря
Table 1. Quality indicators of BCG vaccines for bladder cancer immunotherapy

Наименование показателя качества вакцины <i>Vaccine quality indicator</i>	Тип данных показателей качества <i>Type of data</i>
Общее содержание бактерий Дисперсность Потеря в массе при высушивании Специфическая активность <i>Bacterial concentration</i> <i>Dispersity index</i> <i>Loss on drying</i> <i>Potency</i>	Количественный <i>Quantitative</i>
Описание Подлинность Проходимость через иглу Время восстановления препарата Герметичность (вакуум) Отсутствие посторонней микрофлоры Аномальная токсичность Специфическая безопасность <i>Description</i> <i>Identification</i> <i>Syringeability</i> <i>Reconstitution time</i> <i>Container-closure integrity (vacuum)</i> <i>Bacterial and fungal contamination</i> <i>Abnormal toxicity</i> <i>Virulent mycobacteria</i>	Альтернативный <i>Alternative</i>

Таблица составлена авторами по данным нормативной документации с изменениями / The table is prepared by the authors using the product specification file

сушильного аппарата, а центральные — только от полки. Неравномерный нагрев вызывает разную скорость сублимации, в результате чего внутри одной серии препарата может наблюдаться существенная разница в остаточной влажности. Также на скорость сублимации влаги влияет загрузка камеры — при увеличении количества флаконов в камере скорость сублимации снижается.

Кроме того, определение остаточной влажности гравиметрическим методом сопряжено с некоторыми сложностями технического характера, что влияет на высокую неопределенность результатов измерений, которая связана с большой гигроскопичностью исследуемых образцов препарата вакцины и малыми массами навесок исследуемых образцов [12]. Различие между данными ИЦ и производителя может быть объяснено недостаточным удалением влаги из образцов в процессе испытания на базе предприятия-производителя.

Построение и анализ контрольных карт Шухарта

Применение ККШ предполагает, что исследуемая характеристика подчиняется нормальному распределению, так как коэффициенты, используемые для расчета контрольных границ, выведены для нормального распределения. В ГОСТ Р

ИСО 7870-2-2015¹³ имеется отдельное предупреждение о необходимости проявления осторожности при интерпретации карт индивидуальных значений, если распределение не является нормальным.

Гистограммы распределения для каждого показателя качества представлены на рисунке 1. Проверка данных за 2019–2023 гг. с помощью критерия согласия Пирсона показала, что нормальное распределение выявлено для двух показателей качества: «Дисперсность» (по данным производителя $\chi^2=6,7$; по данным ИЦ $\chi^2=14,03$; критическое значение $\chi^2=14,07$) и «Потеря в массе при высушивании» (по данным производителя $\chi^2=12,56$; по данным ИЦ $\chi^2=4,93$; критическое значение $\chi^2=14,07$). Для остальных показателей значение критерия χ^2 превысило критическое значение: 16,56 для показателя «Общее содержание бактерий»; 35 и 133 для показателя «Специфическая активность» по данным производителя и ИЦ соответственно. Таким образом, построение ККШ по показателям качества «Общее содержание бактерий» и «Специфическая активность» на данном этапе не дает информативного результата. Однако согласно ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015¹⁴ (раздел 6) «небольшие отклонения характеристики процесса от нормального распределения не должны быть препятствием

¹³ ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

¹⁴ Там же.

Таблица 2. Значения показателей качества вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря согласно данным предприятия-производителя и испытательного центра, полученные в 2019–2023 гг.

Table 2. Quality indicators for the BCG vaccine for bladder cancer immunotherapy according to the data submitted by the manufacturer and the data obtained at the testing centre in 2019–2023

Параметр <i>Parameter</i>	Место испытаний <i>Testing site</i>	Показатель качества препарата <i>Product quality indicator</i>			
		Общее содержание бактерий, ОЕ <i>Bacterial concentration, OD</i>	Дисперсность, <i>n</i> <i>Dispersity index, n</i>	Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	Специфическая активность, млн клеток/мг <i>Potency, million cells/mg</i>
Среднее значение <i>Mean value</i>	A	0,35	1,4	1,5	12,22
	B	0,35	1,4	2,9	12,83
Стандартное отклонение <i>Standard deviation</i>	A	0,03	0,1	0,6	2,23
	B	0,03	0,1	0,8	2,82
Минимальное значение <i>Minimum value</i>	A	0,30	1,2	0,4	8,00
	B	0,30	1,2	0,9	8,00
Максимальное значение <i>Maximum value</i>	A	0,39	1,6	3,6	15,00
	B	0,40	1,6	4,8	17,02
Коэффициент корреляции, <i>r</i> <i>Correlation coefficient, r</i>	–	0,34	0,70	0,64	0,58
Значение показателя согласно требованиям НД <i>PSF requirement</i>	–	0,30–0,40	≥1,2	≤5,0	8–15

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

Примечание. А — данные результатов анализа, предоставленные предприятием-производителем; В — данные, полученные при контроле качества в Испытательном центре; НД — нормативная документация.

Note. A, test results submitted by the manufacturer; B, quality control results obtained at the testing centre; PSF, product specification file.

в использовании таких карт как эмпирической процедуры принятия решений» (рис. 2, 3).

Контрольные карты Шухарта по значениям показателя качества «Общее содержание бактерий». На карте индивидуальных значений по показателю «Общее содержание бактерий» (рис. 2А) наблюдалось появление критериев особых причин: выход одной точки за контрольные границы (значение 0,400; результат подтверждается данными производителя), а также выявлены структуры расположения точек по одну сторону от центральной линии (рис. 2А, области выделены красным цветом). Такое расположение точек (тренд) может быть объяснено внесением некоторых изменений в технологический процесс, при которых поменялось среднее значение показателя в данные отрезки времени, при этом среднее значение стандартного отклонения не изменилось, что свидетельствует о стабильности процесса.

Контрольные карты Шухарта по значениям показателя качества «Специфическая

активность». На карте индивидуальных значений по показателю «Специфическая активность» (рис. 3А, В) наблюдался большой разброс значений скользящих размахов, выходы точек за контрольные границы, а также необычные структуры расположения точек. Наиболее вероятно, что широкий диапазон нормативных значений (от 8 до 15 млн клеток/мг) влияет на отсутствие нормального распределения данных (рис. 1Г, Н).

Несмотря на то что культуральный метод является официально рекомендованным ВОЗ¹⁵, он имеет ряд недостатков. Высокая вариабельность результатов метода возможна из-за ошибок разведения, модификации среды во время культивирования и ошибок подсчета. Существенным недостатком метода является способность клеток БЦЖ к агрегации (слипанию), которая обусловлена составом и структурой клеточных мембран этих бактерий¹⁶ [13–16]. Это обстоятельство может вызывать искажение истинного значения показателя числа жизнеспособных

¹⁵ Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. Annex 3. WHO Technical Report Series No. 979. WHO; 2013.

¹⁶ Там же.

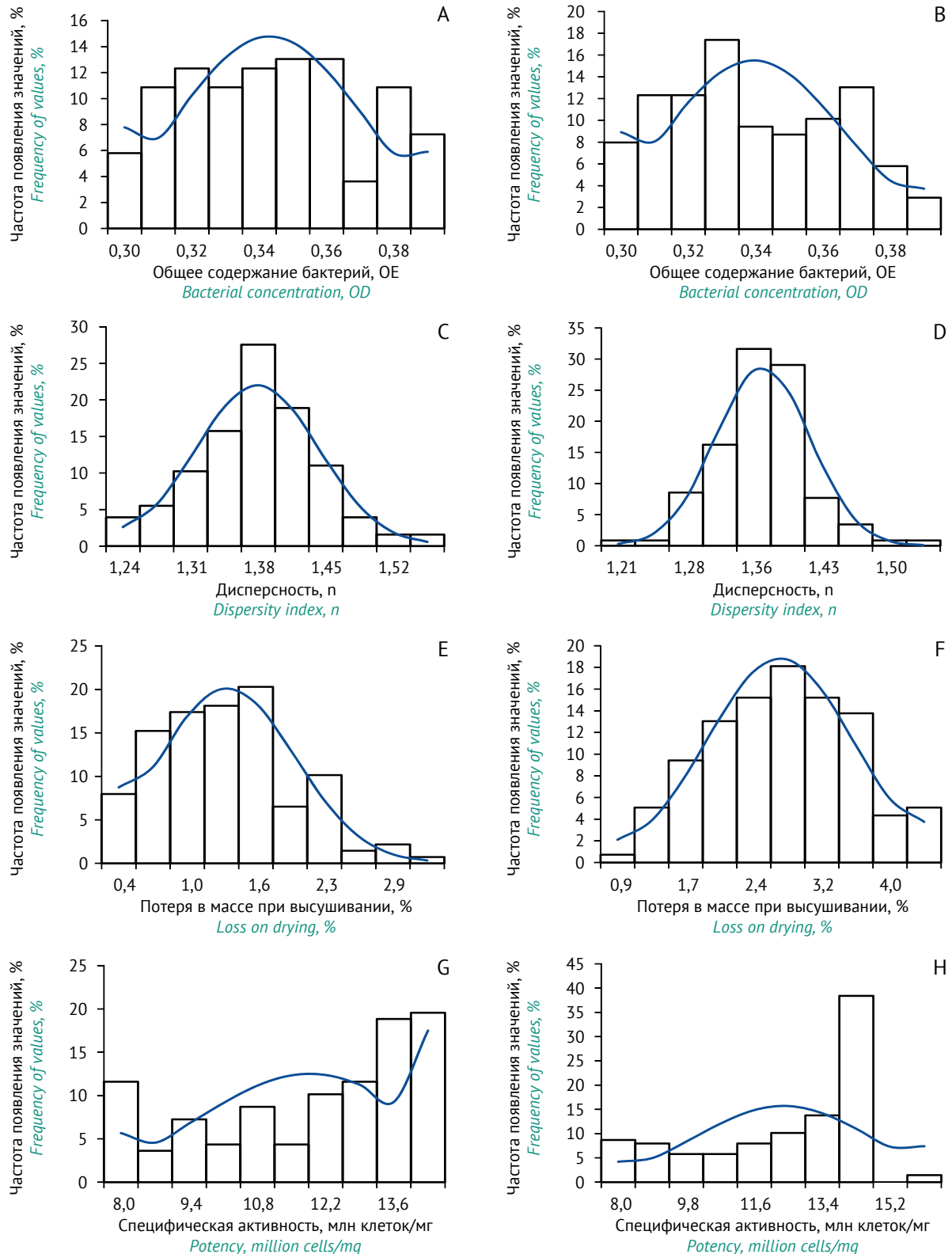


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Гистограммы распределения значений результатов испытаний за 2019–2023 гг. по показателям качества: «Общее содержание бактерий» (А, В), «Дисперсность» (С, D), «Потеря в массе при высушивании» (Е, F), «Специфическая активность» (G, H). А, С, Е, G – результаты анализа предприятия-производителя; В, D, F, H – результаты контроля качества в испытательном центре.

Fig. 1. Histograms showing the distribution of quality test results for 2019–2023 by quality indicators: bacterial concentration (A, B), dispersity index (C, D), loss on drying (E, F), and potency (G, H). A, C, E, G, testing by the manufacturer; B, D, F, H, quality control at the testing centre.

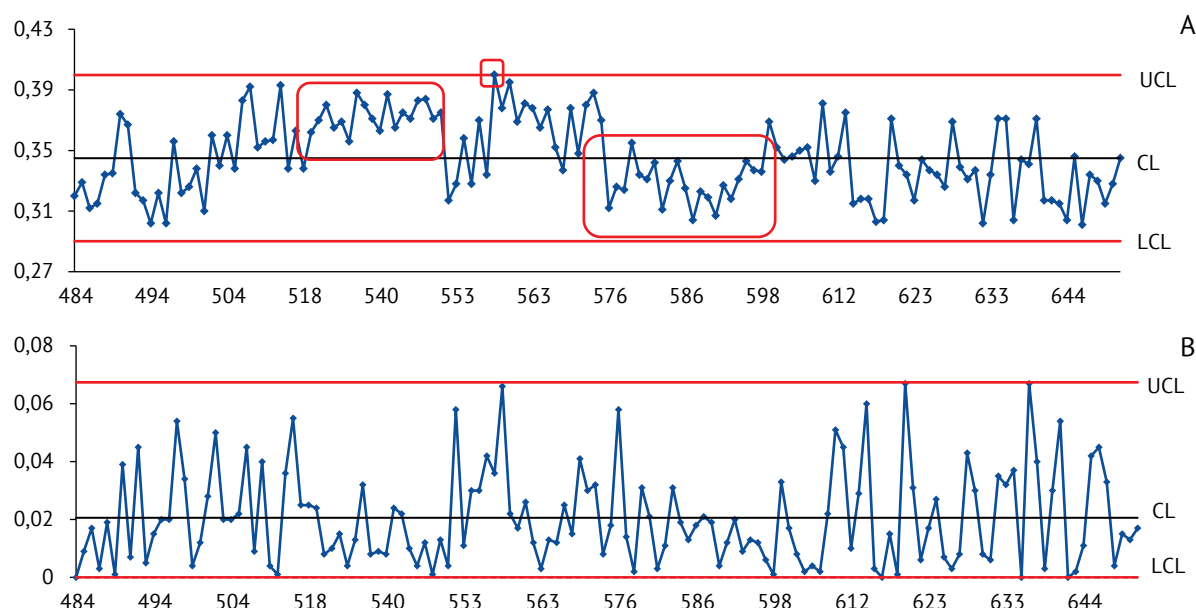


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Контрольные карты по значениям показателя качества «Общее содержание бактерий» вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря, построенные по результатам контроля качества в испытательном центре. На карте индивидуальных значений (А) ось Y – индивидуальные значения показателя «Общее содержание бактерий» (оптические единицы). На карте скользящих размахов (В) ось Y – значения размахов показателя между последовательными сериями препарата. Ось X – порядковые номера серий вакцины. CL – центральная линия; UCL и LCL – верхняя и нижняя контрольные границы. Область, выделенная красным цветом, включает точки, соответствующие одному из критериев особых причин.

Fig. 2. Control charts for the bacterial concentration measured at the testing centre during quality control of the BCG vaccine for bladder cancer immunotherapy. The Y-axis of the individuals control chart (A) shows individual bacterial concentration values (optical density units). The Y-axis of the moving range control chart (B) shows quality indicator ranges between successive batches of the product. The X-axis shows sequential numbers of vaccine batches. CL, central line; UCL/LCL, upper/lower control limits. The area highlighted in red includes points that meet a special cause criterion.

микобактерий в препарате, так как часть микроорганизмов, не давших рост отдельных колоний, не может быть учтена. Также существенное влияние на результаты могут оказывать компоненты питательной среды: для культурального метода анализа как на предприятии-производителе вакцины, так и в ИЦ используется натуральная яичная среда Левенштейна – Йенсена. Натуральные среды характеризуются сложным непостоянным химическим составом, уступают синтетическим средам по стандартности и воспроизводимости результатов [17, 18]. Возможно, при расхождении результатов, полученных предприятием-производителем и ИЦ, также следует обратить внимание на компоненты питательной среды. Учитывая вышеизложенное, производителям и контрольным лабораториям следует рассмотреть альтернативные методы определения специфической активности, основанные на биолюминесценции, колориметрии или проточной цитометрии, отличающиеся быстротой и большей воспроизводимостью.

Контрольные карты Шухарта по значениям показателя качества «Потеря в массе при высушивании». Контрольные карты, по-

лученные по результатам определения показателя «Потеря в массе при высушивании», представлены на рисунке 4. На карте скользящих размахов наблюдалась только одна точка выхода за контрольные границы. На карте индивидуальных значений (рис. 4А) выявлен выход точек за контрольную границу, и неблагоприятные тренды. Отдельно стоит выделить структуру расположения точек (с 639 по 651 серию), формирующую тренд в виде буквы «V», и резкий подъем значений, близкий и к верхней контрольной линии, и к границе нормативных требований, что повышает риск получения серии, не соответствующей требованиям НД.

Представленные данные демонстрируют признаки неуправляемости процесса, что делает невозможным использование полученных контрольных границ для мониторинга качества вакцины и указывает, что процесс был подвергнут воздействию особых причин. В такой ситуации предприятию-производителю необходимо стандартизировать процесс лиофилизации и методики определения потери в массе при высушивании для приведения процесса в статистически управляемое состояние.

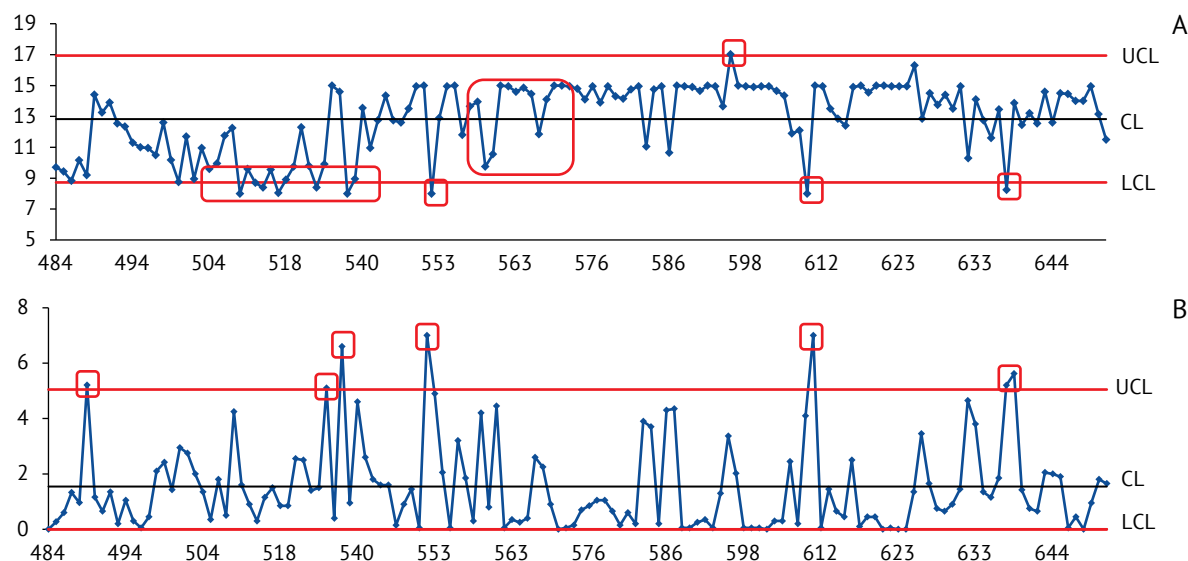


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Контрольные карты по значениям показателя качества «Специфическая активность» вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря, построенные по результатам контроля качества в испытательном центре. На карте индивидуальных значений (А) ось Y – индивидуальные значения показателя «Специфическая активность» (млн клеток/мг). На карте скользящих размахов (В) ось Y – значения размахов показателя между последовательными сериями препарата. Ось X – порядковые номера серий вакцины. CL – центральная линия; UCL и LCL – верхняя и нижняя контрольные границы. Область, выделенная красным цветом, включает точки, соответствующие одному из критериев особых причин.

Fig. 3. Control charts for the potency measured at the testing centre during quality control of the BCG vaccine for bladder cancer immunotherapy. The Y-axis of the individuals control chart (A) shows individual potency values (million cells/mg). The Y-axis of the moving range control chart (B) shows quality indicator ranges between successive batches of the product. The X-axis shows sequential numbers of vaccine batches. CL, central line; UCL/LCL, upper/lower control limits. The area highlighted in red includes points that meet a special cause criterion.

Контрольные карты Шухарта по значениям показателя качества «Дисперсность». При проведении испытаний все значения по показателю качества «Дисперсность» соответствовали требованиям НД – не менее 1,2. Средние значения показателя производителя и ИЦ составили 1,40 и 1,39 соответственно при относительном стандартном отклонении не более 4,8% (табл. 2), что также может свидетельствовать о стабильности как производственного процесса, так и определения значений данного показателя. На построенных ККШ (рис. 5А, В) в начале наблюдаемого периода имелись признаки выхода процесса из состояния статистической управляемости: неоднородность размахов, выход точек за пределы контрольных границ, что может свидетельствовать о влиянии на процесс особых причин. Однако в период после серии 550 выявлена стабилизация процесса.

При оценке стабильности проведения испытаний по данному показателю такими причинами могут являться смещение кюветы, плохая подготовка кюветы, ошибки при пробоподготовке, неверная установка длины волны. В соответствии

с ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015¹⁷ данные, на которые могли повлиять эти причины, должны быть удалены, а контрольные границы пересчитаны.

Точки, оставшиеся после удаления данных за 2019 г., отображают собственную изменчивость процесса; контрольная карта демонстрирует состояние статистической управляемости, в связи с чем можно рассчитать более точные контрольные границы (рис. 6).

Новые контрольные границы, определенные в ходе испытаний на подтверждение соответствия требованиям показателя качества «Дисперсность», можно использовать для дальнейшего мониторинга стабильности показателей качества в реальном времени с параметрами, приведенными в таблице 3.

Таким образом, представленные в работе данные продемонстрировали признаки нестабильности процесса производства и/или процесса проведения испытания при оценке качества вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря по показателям «Специфическая активность» и «Потеря в массе при высушивании». Принимая во внимание, что полученные результаты

¹⁷ ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

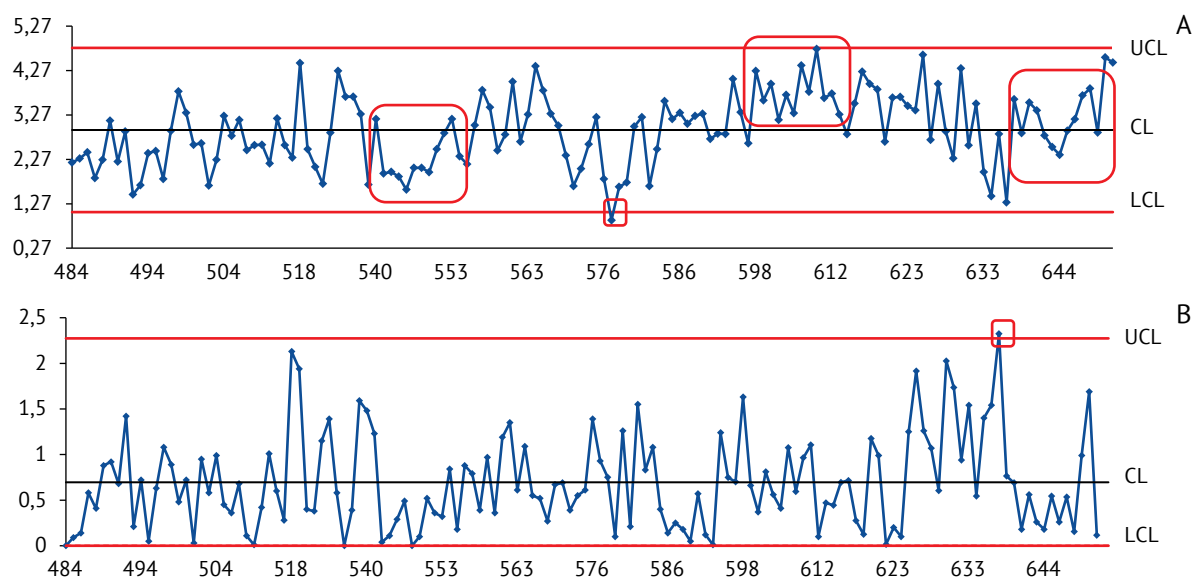


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Контрольные карты по значениям показателя качества «Потеря в массе при высушивании» вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря, построенные по результатам контроля качества в испытательном центре. На карте индивидуальных значений (А) ось Y – индивидуальные значения показателя «Потеря в массе при высушивании» (%). На карте скользящих размахов (В) ось Y – значения размахов показателя между последовательными сериями препарата. Ось X – порядковые номера серий вакцины. CL – центральная линия; UCL и LCL – верхняя и нижняя контрольные границы. Область, выделенная красным цветом, включает точки, соответствующие одному из критериев особых причин.

Fig. 4. Control charts for the loss on drying measured at the testing centre during quality control of the BCG vaccine for bladder cancer immunotherapy. The Y-axis of the individuals control chart (A) shows individual loss-on-drying results (%). The Y-axis of the moving range control chart (B) shows quality indicator ranges between successive batches of the product. The X-axis shows sequential numbers of vaccine batches. CL, central line; UCL/LCL, upper/lower control limits. The area highlighted in red includes points that meet a special cause criterion.

по показателю «Специфическая активность» не имеют нормального распределения, а показатель характеризуется широким диапазоном нормативных значений, построение контрольных

границ для последующего мониторинга с помощью контрольных карт на данном этапе затруднительно. Однако согласно требованиям ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 (раздел 6)¹⁸ «небольшие отклонения

Таблица 3. Параметры для мониторинга стабильности производства вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря по показателю качества «Дисперсность»

Table 3. Parameters for monitoring the consistency of production of the BCG vaccine for bladder cancer immunotherapy by the dispersity index

Параметр <i>Parameter</i>	Значение параметра <i>Parameter value</i>
Количество данных <i>Amount of data</i>	68
Среднее значение показателя <i>Mean value of the quality indicator</i>	1,394
Верхняя контрольная граница <i>Upper control limit</i>	1,482
Нижняя контрольная граница <i>Lower control limit</i>	1,307
Среднее значение скользящих размахов <i>Mean value of moving ranges</i>	0,033
Верхняя контрольная граница карты скользящих размахов <i>Upper control limit for the moving range chart</i>	0,107

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

¹⁸ ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

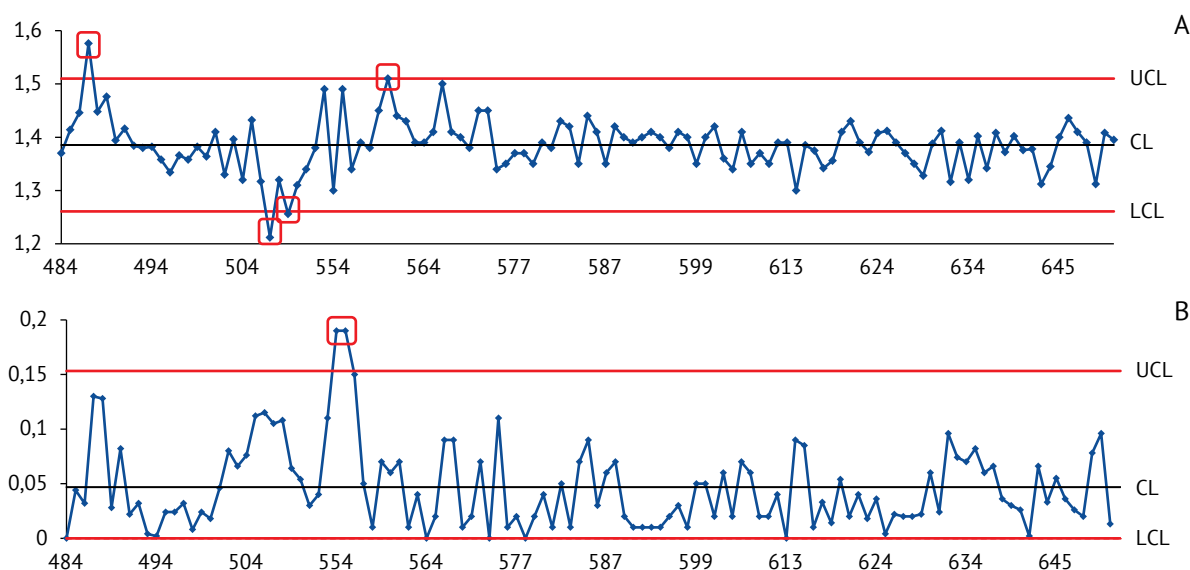


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Контрольные карты по значениям показателя качества «Дисперсность» вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря, построенные по результатам контроля качества в испытательном центре. На карте индивидуальных значений (А) ось Y – индивидуальные значения показателя «Дисперсность» (n). На карте скользящих размахов (В) ось Y – значения размахов показателя между последовательными сериями препарата. Ось X – порядковые номера серий вакцины. CL – центральная линия; UCL и LCL – верхняя и нижняя контрольные границы. Область, выделенная красным цветом, включает точки, соответствующие одному из критериев особых причин.

Fig. 5. Control charts for the dispersity index measured at the testing centre during quality control of the BCG vaccine for bladder cancer immunotherapy. The Y-axis of the individuals control chart (A) shows individual dispersity index values (n). The Y-axis of the moving range control chart (B) shows quality indicator ranges between successive batches of the product. The X-axis shows sequential numbers of vaccine batches. CL, central line; UCL/LCL, upper/lower control limits. The area highlighted in red includes points that meet a special cause criterion.

характеристики процесса от нормального распределения не должны быть препятствием в использовании таких карт как эмпирической процедуры принятия решений».

Представленные данные по показателю «Потеря в массе при высушивании» указывают на признаки неуправляемости процесса, что делает невозможным использование полученных контрольных границ для мониторинга качества вакцины и свидетельствуют о необходимости стандартизации процесса лиофилизации и методики испытания. Таким образом, допускается возможность внедрения постоянного мониторинга производственного процесса даже в условиях его нестабильности.

Проведенный с помощью контрольных карт Шухарта анализ показателей качества «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность» свидетельствует о стабильности процесса производства препарата вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря, однако наличие предупреждающих сигналов указывает на необходимость проведения дополнительных мероприятий, направленных на стандартизацию технологического процесса.

Выводы

1. Определены показатели качества вакцины для иммунотерапии рака мочевого пузыря, которые можно использовать для статистического анализа с помощью контрольных карт Шухарта: «Общее содержание бактерий», «Дисперсность», «Потеря в массе при высушивании» и «Специфическая активность».

2. При сравнительном анализе средних значений показателей качества предприятия-производителя и испытательного центра установлено, что для показателей «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность» средние значения и их стандартные отклонения совпали и составляли $0,35 \pm 0,03$ ОЕ и $1,4 \pm 0,1$ соответственно. Для показателей «Потеря в массе при высушивании» и «Специфическая активность» наблюдается расхождение средних значений между предприятием-производителем и испытательным центром. Так, по показателю «Потеря в массе при высушивании» средние значения составили $1,5 \pm 0,6$ и $2,9 \pm 0,8\%$, а по показателю «Специфическая активность» – $12,22 \pm 2,23$ и $12,83 \pm 2,82$ млн клеток/мг соответственно. При посерийном корреляционном анализе

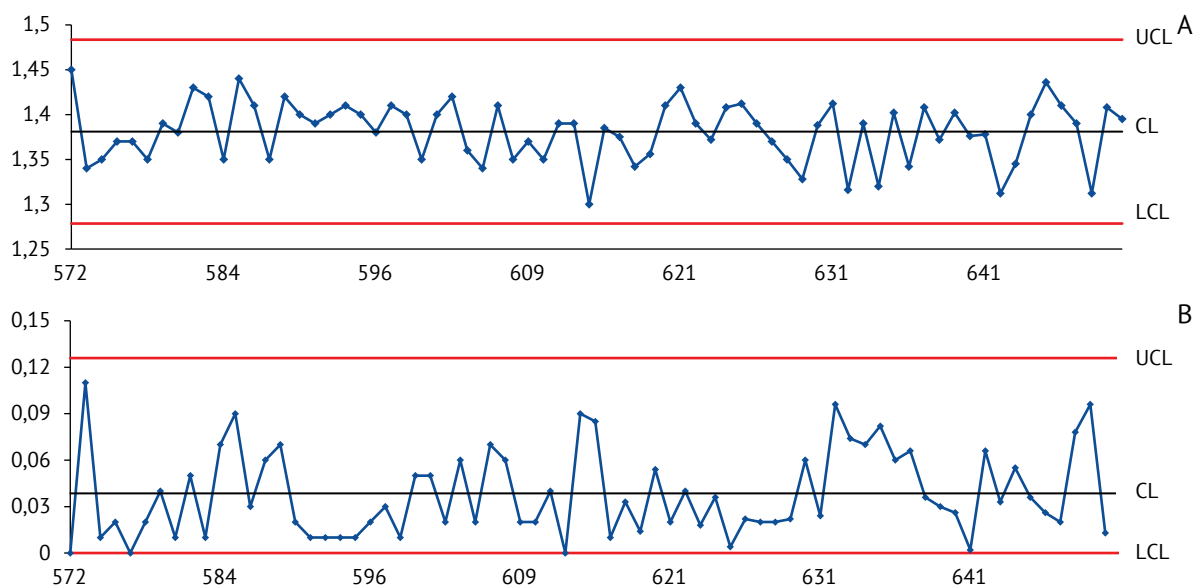


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 6. Контрольные карты по значениям показателя качества «Дисперсность» вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря, построенные по результатам контроля качества в испытательном центре после удаления данных по препаратам серий 484–571. На карте индивидуальных значений (А) ось Y – индивидуальные значения показателя «Дисперсность» (n); на карте скользящих размахов (В) ось Y – значения размахов показателя между последовательными сериями препарата. Ось X – порядковые номера серий вакцины. CL – центральная линия; UCL и LCL – верхняя и нижняя контрольные границы.

Fig. 6. Control charts for the dispersity index measured at the testing centre during quality control of the BCG vaccine for bladder cancer immunotherapy, without the results for batches 484–571. The Y-axis of the individuals control chart (A) shows individual dispersity index values (n). The Y-axis of the moving range control chart (B) shows quality indicator ranges between successive batches of the product. The X-axis shows sequential numbers of vaccine batches. CL, central line; UCL/LCL, upper/lower control limits.

наблюдалась выраженная связь для всех показателей кроме показателя «Общее содержание бактерий» – значения коэффициента корреляции (r) составляли от 0,34 до 0,70.

3. При оценке данных испытательного центра с помощью критерия согласия Пирсона выявлено нормальное распределение для показателей качества «Дисперсность» ($\chi^2=14,03$) и «Потеря в массе при высушивании» ($\chi^2=4,93$). При анализе карт по показателям «Потеря в массе при высушивании» и «Специфическая активность» наблюдались признаки выхода процесса производства и/или процесса проведения испытания из состояния статистической управляемости. При мониторинге показателей «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность» выявлено, что было достигнуто состояние статистической управляемости. Установлены параметры для дальнейшего мониторинга стабильности производства

вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря по показателю «Дисперсность» в реальном времени: значение верхней контрольной границы – 1,482; значение нижней контрольной границы – 1,307; значение верхней контрольной границы карты скользящих размахов – 0,107.

4. Проведенная оценка данных показала, что технологический процесс и/или методика проведения испытаний вакцины выходили из состояния статистической управляемости. Продемонстрирована необходимость внедрения контрольных карт Шухарта и постоянного мониторинга стабильности показателей качества для повышения стандартизации процессов и обеспечения высокого уровня выпускаемой продукции как на производстве вакцины, так и в испытательном центре, а также целесообразность дальнейших совместных исследований.

Литература/References

1. Jeong SH, Han JH, Jeong CW, Kim HH, Kwak C, Yuk HD, Ku JH. Clinical determinants of recurrence in pTa bladder cancer following transurethral resection of bladder tumor. *BMC Cancer*. 2022;22(1):631. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09733-8>
2. Коняшкина СЮ, Рева СА, Петров СБ. Лабораторные предикторы ответа на внутрипузырную БЦЖ-терапию у пациентов с немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря. *Вестник урологии*. 2022;10(4):155–64.

- Konyashkina SYu, Reva SA, Petrov SB. Laboratory predictors to intravesical BCG therapy response in patients with non-muscle invasive bladder cancer. *Urology Herald*. 2022;10(4):155–64 (In Russ.). <https://doi.org/10.21886/2308-6424-2022-10-4-155-164>
3. Herr HW, Morales A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J Urol*. 2008;179(1):53–6. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.08.122>
 4. Jiang S, Redelman-Sidi G. BCG in bladder cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2022;14(13):3073. <https://doi.org/10.3390/cancers14133073>
 5. Mukherjee N, Julián E, Torrelles JB, Svatek RS. Effects of *Mycobacterium bovis* Calmette et Guérin (BCG) in oncotherapy: bladder cancer and beyond. *Vaccine*. 2021;39(50):7332–40. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.09.053>
 6. Солонин СИ. Метод контрольных карт. М.–Берлин: Директ-Медиа; 2015.
Solonin SI. Control charts method. Moscow–Berlin: Direct-Media; 2015 (In Russ.). EDN: [VQENBJ](#)
 7. Шпер ВЛ. Инструменты качества и не только! Часть 7. Контрольные карты Шухарта (продолжение). *Методы менеджмента качества*. 2022;(2):48–54.
Shper VL. Quality tools and something more! Part 7. Shewhart control charts (continued). *Methods of Quality Management*. 2022;(2):48–54 (In Russ.). EDN: [CSBWIH](#)
 8. Ильюченко ИЮ, Чернова АП. Мониторинг системы водоподготовки. Контрольные карты Шухарта. *Лаборатория и производство*. 2020;13(3–4):130–9.
Ilyuchenko IYu, Chernova AP. Water treatment monitoring systems. Shewhart control charts. *Laboratory and Production*. 2020;13(3–4):130–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.32757/2619-0923.2020.3-4.13.130.139>
 9. Zhu Fugen. Application of Shewhart control charts in the inspection of pharmaceutical manufacturing process. *Int J Pharm Chem*. 2019;5(1):1–11. <https://doi.org/10.11648/j.ijpc.20190501.11>
 10. Suman G, Prajapati DR. Control chart applications in healthcare: a literature review. *Int J Metrol Qual Eng*. 2018;(9):5. <https://doi.org/10.1051/ijmqe/2018003>
 11. Савина АА, Александрова НВ, Немировская ТИ. Мониторинг показателей качества вакцин для профилактики туберкулеза методом контрольных карт Шухарта. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):310–20.
Savina AA, Aleksandrova NV, Nemirovskaya TI. Using Shewhart charts to monitor quality characteristics of preventive vaccines for tuberculosis. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):310–20 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-310-320>
 12. Фадейкина ОВ, Воропаев АА, Давыдов ДС, Волкова РА. Оценка неопределенности результатов измерений при определении потери в массе при высушивании биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):452–62.
Fadeikina OV, Voropaev AA, Davydov DS, Volkova RA. Estimation of measurement uncertainty for the determination of loss on drying of biologicals. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3–1):452–62 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-452-462>
 13. Moghawry HM, Rashed ME, Gomaa K, AbdelGhani S, Dishisha T. Development of a fast and precise potency test for BCG vaccine viability using flow cytometry compared to MTT and colony-forming unit assays. *Sci Rep*. 2023;13(1):11606. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38657-x>
 14. Yang YC, Tsai MH, Cheng HF. Determine the potency of BCG vaccines by flow cytometer. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2011;(25):2394–8. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0048>
 15. Singh Jadaun GP, Kasana H, Malik N. Quality control testing of BCG vaccine: current practices and technological advancements. *Int J Vaccine Res*. 2016;1(1):4. <https://doi.org/10.15226/2473-2176/1/1/00103>
 16. Gweon E, Choi C, Kim J, Kim B, Kang H, Park T, et al. Development of a new approach to determine the potency of bacille Calmette–Guérin vaccines using flow cytometry. *Osong Public Health Res Perspect*. 2017;8(6):389–96. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2017.8.6.06>
 17. Федорова ОВ, Понкратова СА, Валева РТ, Исламгулов ИР. Питательные среды в производствах медицинских и ветеринарных препаратов. *Вестник Технологического университета*. 2017;20(4):130–3.
Fedorova OV, Ponkratova SA, Valeeva RT, Islamgulov IR. Growth media in the production of medicinal products for human and veterinary use. *Bulletin of Technological University*. 2017;20(4):130–3 (In Russ.). EDN: [XYEEVX](#)
 18. Ларионова ЕЕ, Андриевская ИЮ, Андреевская СН, Смирнова ТГ, Севастьянова ЭВ. Культуральный метод исследования микобактерий. Плотные питательные среды. *Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза*. 2020;(3):75–86.
Larionova EE, Andrievskaya IYu, Andreevskaya SN, Smirnova TG, Sevastianova EV. Culture method for studying mycobacteria. Solid growth media. *CTRI Bulletin*. 2020;(3):75–86 (In Russ.). <https://doi.org/10.7868/S2587667820030103>

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

Благодарности. Авторы благодарят О.В. Чапой, инженера-лаборанта лаборатории бактериальных вакцин, и Т.Н. Ермолаеву, эксперта 1 категории лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, за помощь в выполнении экспериментальной части работы.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.A. Savina** tested vaccine samples for the quality indicators of interest, summarised the experimental data, analysed and interpreted the results, conceptualised the study, critically revised the manuscript, and approved the final version for publication. **A.A. Voropaev** conceptualised the study, tested vaccine samples for the quality indicators of interest, analysed and interpreted the study results, and drafted the manuscript. **A.A. Alesina** tested vaccine samples for the quality indicators of interest, analysed and interpreted the study results, and drafted the manuscript.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to O.V. Chapoi, Laboratory Technician, Laboratory of Bacterial Vaccines, Centre for Biological Medicinal Products Evaluation and Control, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, and T.N. Ermolaeva, 1st Professional Category Expert, Laboratory of Bacteriophages and Normal Flora Preparations with a Collection of Microorganisms, Centre for Biological Medicinal Products Evaluation and Control, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, for their help with the experiments.

Об авторах / Authors

Савина Анна Александровна

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

Savina@expmed.ru

Воропаев Андрей Андреевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>

voropaev@expmed.ru

Алесина Анна Алексеевна

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-9803-2897>

alesina@expmed.ru

Поступила 30.10.2023

После доработки 01.02.2024

Принята к публикации 29.02.2024

Anna A. Savina

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

Savina@expmed.ru

Andrey A. Voropaev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>

voropaev@expmed.ru

Anna A. Alesina

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-9803-2897>

alesina@expmed.ru

Received 30 October 2023

Revised 1 February 2024

Accepted 29 February 2024

УДК 579.61

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-91-102>

Научная статья | Scientific article



Получение рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* и изучение его иммунобиологических свойств

А.П. Жеребцов✉, А.А. Калошин, 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

✉ Калошин Алексей Алексеевич; alex-k-1973@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ. Учитывая множественную устойчивость к антимикробным препаратам *Pseudomonas aeruginosa* — одного из основных возбудителей очаговых и генерализованных форм гнойно-воспалительных заболеваний у людей с ослабленным иммунитетом, актуальной представляется разработка эффективных профилактических вакцин против *P. aeruginosa*, а также усиление защитных свойств вакцин путем подбора адъювантов. Является перспективным использование флагеллина жгутиков *P. aeruginosa* как индуктора системы врожденного иммунитета за счет взаимодействия с толл-подобным рецептором 5-го типа (TLR5) и активатора Т-клеточного иммунного ответа в качестве компонента или адъюванта при разработке вакцин.

ЦЕЛЬ. Получение рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa* и изучение его иммуногенных, протективных и адъювантных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Нуклеотидную последовательность гена *fliC* синтезировали с помощью ПЦР на основе матричной ДНК *P. aeruginosa* PA-103 и встраивали в плазмиду pQE-30 для последующей экспрессии в клетках *Escherichia coli* M15. Очистку рекомбинантного флагеллина С (FliC) *P. aeruginosa* проводили в два этапа: выделение телец включения и их последующее растворение в буферных растворах, содержащих мочевины и гуанидин гидрохлорид. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно двукратно с двухнедельным интервалом с использованием очищенного рекомбинантного белка FliC (доза — 50 мкг на животное) и его комбинацией с поверхностным антигеном *Klebsiella pneumoniae* (соотношение 1:1). Образцы сыворотки крови иммунизированных мышей исследовали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) на наличие специфических антител к FliC. Защитные свойства FliC оценивали при экспериментальном внутрибрюшинном заражении мышей культурами *P. aeruginosa* PA-103 и *K. pneumoniae* № 204.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Получен штамм-продуцент рекомбинантного флагеллина С. Проведена разработка рекомбинантного белка FliC и его очистка (степень чистоты 97,6%). При анализе образцов сыворотки иммунизированных мышей в ИФА и оценке защитных свойств от экспериментально вызываемой инфекции показано, что очищенный рекомбинантный белок FliC обладал иммуногенными свойствами. В группе мышей, иммунизированных FliC, индекс эффективности защитных свойств при инфицировании *P. aeruginosa* соответствовал 3,0, что свидетельствует о протективном эффекте FliC. Рекомбинантный белок FliC проявлял адъювантные свойства при сочетанном использовании с поверхностным антигеном *K. pneumoniae* при инфицировании *K. pneumoniae* — индекс эффективности составил 6,1.

ВЫВОДЫ. Очищенный рекомбинантный флагеллин *P. aeruginosa* обладал протективной активностью при экспериментальной синегнойной инфекции у мышей и проявлял адъювантные свойства при сочетанном введении с поверхностным антигеном *K. pneumoniae*, увеличивая его иммуногенность. Использование рекомбинантного флагеллина С перспективно для создания кандидатной вакцины против синегнойной инфекции.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumoniae*; флагеллин C; рекомбинантный белок; FliC; адъювантные свойства; иммуногенность; экспериментальное инфицирование мышей

Для цитирования: Жеребцов А.П., Калошин А.А., Михайлова Н.А. Получение рекомбинантного флагеллина C *Pseudomonas aeruginosa* и изучение его иммунобиологических свойств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):91–102. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-91-102>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

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

Production and immunological characterisation of recombinant flagellin C of *Pseudomonas aeruginosa*

Anton P. Zherebtsov✉, Alexey A. Kaloshin, Natalia A. Mikhailova

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

✉ Alexey A. Kaloshin; alex-k-1973@yandex.ru

ABSTRACT

SCIENTIFIC RELEVANCE. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the main causative agents of focal and diffuse suppurative inflammations in immunocompromised individuals. The multiple antimicrobial resistance of *P. aeruginosa* has created an urgent need to develop effective preventive vaccines against this bacterium and to enhance their protective properties by selecting adjuvants. A promising strategy is to use flagellin, a *P. aeruginosa* flagellum component inducing the innate immune system through interaction with toll-like receptor 5 (TLR5) and activating the T-cell immune response, as a component or adjuvant in vaccine development.

AIM. This study aimed to produce recombinant flagellin C (FliC) of *P. aeruginosa* and investigate its immunogenicity, adjuvanticity, and protective properties.

MATERIALS AND METHODS. The *fliC* nucleotide sequence was obtained by PCR on template DNA of *P. aeruginosa* PA-103 and was inserted into the pQE-30 plasmid for subsequent expression in *Escherichia coli* M15. Recombinant FliC purification involved two stages: isolation of inclusion bodies and their dissolution in buffers containing urea and guanidine hydrochloride. Mice were immunised by two intraperitoneal injections with a two-week interval. The immunisation used purified recombinant FliC at a dose of 50 µg per animal and its combination with the *Klebsiella pneumoniae* surface antigen in a 1:1 ratio. Serum samples from immunised mice were tested for specific antibodies to recombinant FliC by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protective properties of FliC were assessed by intraperitoneal challenge of mice with cultures of *P. aeruginosa* PA-103 and *K. pneumoniae* 204.

RESULTS. The authors obtained the producing strain, generated recombinant FliC, and purified the protein to a 97.6% purity. The analysis of serum samples from immunised mice by ELISA and the protection assessment in challenge experiments showed that the purified recombinant FliC protein had immunogenic properties. Furthermore, the experimental challenge of FliC-immunised mice with *P. aeruginosa* confirmed that recombinant FliC had protective properties, as evidenced by the protection index of 3.0. Recombinant FliC exhibited adjuvant properties, as demonstrated by the effectiveness index of 6.1 observed in the experimental challenge of mice immunised with the combination of recombinant FliC and the surface antigen of *K. pneumoniae*.

CONCLUSIONS. The purified recombinant FliC protein of *P. aeruginosa* demonstrated protective activity in mice challenged with *P. aeruginosa* and adjuvant properties when combined with the *K. pneumoniae* surface antigen, increasing the immunogenicity of the latter. The use of recombinant FliC holds promise for the creation of a candidate vaccine against *P. aeruginosa* infection.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumoniae*; flagellin C; recombinant protein; FliC; adjuvanticity; immunogenicity; experimental infection of mice

For citation: Zherebtsov A.P., Kaloshin A.A., Mikhailova N.A. Production and immunological characterisation of recombinant flagellin C of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):91–102. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-91-102>

Funding. The study was performed without external funding.

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

Введение

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – аэробная грамотрицательная бактерия палочковидной формы с одним или двумя полярно расположенными жгутиками. *P. aeruginosa* обладает многочисленными факторами патогенности. В Российской Федерации *P. aeruginosa* является одним из основных микробных возбудителей нозокомиальных инфекций [1, 2] и вызывает большое количество внутрибольничных осложнений, которые характеризуются высокой летальностью. Из-за природной и приобретенной резистентности *P. aeruginosa* к антибиотикам доступный выбор эффективных антисинегнойных препаратов сокращается [3–5], в связи с чем проблема разработки эффективных терапевтических препаратов для защиты от данной инфекции приобретает высокую медико-социальную значимость.

Одним из важных факторов патогенности *P. aeruginosa* является белок флагеллин – структурный компонент жгутика бактериальных клеток. Жгутик *P. aeruginosa* состоит из базального тела, крючка и нити и по структуре представляет собой многочисленные спирально расположенные копии белка флагеллина. Помимо роли в передвижении жгутик имеет решающее значение в некоторых других аспектах выживания, размножения и патогенности бактерий, таких как адгезия, секреция факторов вирулентности и образование биопленок [6]. Флагеллин является индуктором системы врожденного иммунитета за счет взаимодействия с толл-подобным рецептором 5 типа (toll-like receptor 5, TLR5) [7, 8]. TLR5 после связывания с флагеллином бактерий и последующей активации NF-κB через адаптерный белок MyD88 вызывает продукцию противовоспалительных цитокинов. В экспериментальных исследованиях на мышах при введении флагеллина *Salmonella typhimurium* выявлен защитный эффект в отношении токсических воздействий бактерий, вирусов и радиации [9]. Кроме того, показана способность флагеллина вызывать активацию иммунного

ответа и выступать в роли адъюванта при разработке вакцин; различные типы флагеллинов *S. typhimurium* продемонстрировали иммунотенный эффект для разных вакцин-кандидатов [10]. Флагеллин C (FliC) *P. aeruginosa* считается перспективным для включения в состав различных кандидатных вакцин [11], однако свойства флагеллина C остаются до конца неизученными.

Таким образом, исследование рекомбинантного флагеллина в качестве компонента вакцины против *P. aeruginosa* для стимуляции специфического иммунитета, а также в качестве адъюванта для усиления протективных свойств компонентов гибридных белков имеет важное значение. При этом иммуностимулирующие домены флагеллина возможно не только использовать в составе антисинегнойной вакцины, но и применять в составе других препаратов. Особый интерес вызывает исследование адъювантных свойств флагеллина C в сочетанной иммунизации с поверхностным антигеном *Klebsiella pneumoniae*, представляющим собой белки наружной мембраны и ЛПС, который успешно применяется в вакцинном препарате Иммуновак-ВП-4 [12].

Цель работы – получение рекомбинантного флагеллина C *P. aeruginosa* и изучение его иммуногенных, протективных и адъювантных свойств.

Материалы и методы

Клонирование гена *fliC*

Полноразмерную нуклеотидную последовательность гена флагеллина C, *fliC*, синтезировали с помощью ПЦР на основе матричной ДНК штамма *P. aeruginosa* PA-103 (коллекция лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова). Подбор праймеров проводили с использованием полноразмерной последовательности ДНК штамма *P. aeruginosa* PA-103 (база данных GenBank¹).

Аmplифицированный ген *fliC* встраивали в плазмиду pTZ57R с помощью коммерческого набора Inst/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Литва). Далее клонированный

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/647734823>

ген *fliC* вырезали из промежуточной плазмиды и встраивали по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III в плазмиду pQE-30 (Qiagen).

Получение штамма-продуцента рекомбинантного белка FliC

Полученной конструкцией трансформировали клетки штамма *E. coli* M15 (Qiagen). Отбор клонов проводили при помощи рестриктового анализа и секвенирования. Для индукции экспрессии добавляли изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид, ИПТГ (Amresco, США). Белковые продукты анализировали с использованием электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли; окрашивание геля проводили красителем Кумасси R-250. В качестве белковых маркеров использовали набор белков с молекулярными массами 20, 25, 35, 50, 85, 120 кДа (Thermo Fisher Scientific, США).

Получение тельца включения

Осадок бактериальной биомассы, полученной из 1 л культуральной жидкости, растворяли в литическом буфере (фосфатно-солевой буфер, 5 мМ ЭДТА, 7 мМ β -меркаптоэтанол, pH 7,0). Суспензию подвергали ультразвуковой дезинтеграции с использованием гомогенизатора ультразвукового Cole-Parmer 130-Watt Ultrasonic Processors (Cole-Parmer, США) в режиме максимальной мощности – 130 Вт. Далее проводили центрифугирование (Avanti J-E, Beckman Coulter, США) нерастворившейся фракции при скорости 10000 об/мин при 4 °C в течение 10 мин и затем удаляли супернатант. Полученный осадок ресуспендировали в растворе, содержащем 10 мМ NaCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ CaCl₂, 40 мМ Tris-HCl, pH 8,0, добавляли 10 мг/л РНКазы А (Sigma, США) и 10 мг/мл ДНКазы I (Sigma, США) и инкубировали 15 мин при температуре 37 °C. Полученную суспензию центрифугировали при скорости 10000 об/мин при 4 °C 10 мин с последующим удалением супернатанта. Осадок ресуспендировали в 20 мл отмывочного фосфатного буфера, содержащего 5 мМ ЭДТА, 20% сахарозы и 1% Triton X-100, и инкубировали 10 мин при 4 °C. Затем центрифугировали со скоростью 10000 об/мин в течение 30 мин при 4 °C и собирали осадок, содержащий тельца включения.

Очистка рекомбинантного белка FliC

Для очистки рекомбинантного белка FliC, содержащегося в тельцах включения, была разработана оригинальная технология [13], основными этапами которой являются: удаление

примесей, растворимых в буфере, содержащем 8 М мочевины; растворение рекомбинантного белка FliC в буфере, содержащем 6 М гуанидина хлорида; перевод рекомбинантного белка FliC в нативные условия при помощи диализа. Для проведения очистки применяли следующие буферные растворы: 8 М мочевины, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 4 М мочевины, 0,1 М NaH₂PO₄, 0,01 М Tris-HCl, pH 8,0; 6 М гуанидин гидрохлорид, 0,1 М NaH₂PO₄, 0,01 М Tris-HCl, pH 8,0. В нативные условия рекомбинантный белок FliC переводили с помощью диализа (диаметр пор мембраны 12,5 кДа) против 50 мМ Tris-HCl, pH 9,0 с шестью сменами буфера с интервалами 4 ч.

Определение концентрации эндотоксинов

Определение концентрации эндотоксинов в препаратах проводили с использованием количественного хромогенного ЛАЛ-теста (Nycult Biotech, Нидерланды) по конечной точке согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации ОФС.1.2.4.0006.15².

Определение степени чистоты полученной белковой фракции рекомбинантного белка FliC

Оценка чистоты полученной белковой фракции рекомбинантного белка FliC проводилась при помощи обработки результатов электрофореза в ПААГ с использованием программного обеспечения Phoretix 1D (Total Lab, Великобритания).

Иммунизация мышей рекомбинантным белком FliC

Экспериментальные работы проводили на беспородных мышках-самках массой 14–16 г (питомник «Филиал Андреевка ФГБУН НЦБМТ ФМБА России»). Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен Локальным советом по этике при ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол учреждения № 7 от 29.09.2022).

Изучение протективных и адъювантных свойств рекомбинантного белка FliC проводили в опытах по иммунизации животных, которых далее подвергали инфицированию *K. pneumoniae* № 204 и *P. aeruginosa* PA-103 (из коллекции лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова). Для постановки экспериментов были сформированы 4 опытные группы мышей численностью по 40 особей, которым двукратно внутрибрюшинно с интервалом в 14 сут вводили тестируемые препараты: группа 1 – рекомбинантный белок FliC в дозе

² ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

50 мкг на животное; группа 2 — смесь рекомбинантного белка FliC и поверхностного антигена *K. pneumoniae* (предоставлен лабораторией протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова) в дозах по 50 мкг на животное; группа 3 — поверхностный антиген *K. pneumoniae* в дозе 50 мкг на животное; группа 4 — смесь рекомбинантного белка FliC и поверхностного антигена *K. pneumoniae* в дозах по 50 мкг на животное. Две контрольные группы (группы 5 и 6) включали по 40 мышей.

Исследование гуморального иммунного ответа при иммунизации рекомбинантным белком FliC

Через 14 сут после иммунизации у пяти мышей из каждой группы брали кровь и в сыворотке определяли титры специфических антител к рекомбинантному белку FliC с использованием иммуноферментного анализа (ИФА). В лунках 96-луночного планшета (Costar, США) сорбировали рекомбинантный белок FliC в концентрации 10 мг/мл в течение ночи при 4 °С. При анализе использовали конъюгат антител кролика к IgG, IgA, IgM мыши с пероксидазой хрена в рабочих разведениях 1:5000 (ИМТЕК, Россия). В качестве субстрата применяли тетраметилбензидин. Определение оптической плотности проводили на спектрофотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм. За положительный титр принимали разведения сыворотки, при которых фиксировали показатели оптической плотности (ОП), превышающие в два раза значения в контрольных лунках.

Экспериментальное инфицирование мышей

Экспериментальное инфицирование культурами *P. aeruginosa* PA-103 или *K. pneumoniae* № 204 проводили через две недели после курса иммунизации. Вирулентные культуры вводили мышам внутривентально, используя по пять доз (с двукратным шагом) для каждой группы. Животным опытных групп (1–4) вводили 12,5; 25; 50; 100 и 200 млн микробных клеток (м.к.) на одну мышь. Животным контрольных групп (5 и 6) вводили 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 млн м.к. на одну мышь. Животных групп 1, 2 и 5 инфицировали *P. aeruginosa* PA-103, а животных групп 3, 4, и 6 — *K. pneumoniae* № 204. Через 7 сут после заражения проводили подсчет павших животных и рассчитывали ЛД₅₀ (доза, вызывающая гибель 50% экспериментальных животных). Оценивали протективные и адъювантные свойства рекомбинантного FliC, основываясь на показателе ЛД₅₀ и индексе эффективности в исследуемых группах.

Статистическая обработка результатов

ЛД₅₀ вычисляли по формуле Кербера в модификации согласно руководству И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [14] (1):

$$\lg \text{ЛД}_{50} = \lg A - \lg 2 \times (B_1/C_1 + B_2/C_2 + B_3/C_3 + B_4/C_4 + B_5/C_5 - 0,5), \quad (1)$$

где A — максимальная инфекционная доза в опыте; B — количество животных, павших в группе; C — общее количество животных в группе; число в нижнем индексе означает номер заражающей дозы. Определение доверительных интервалов ЛД₅₀ при $p=0,95$ проводили согласно руководству И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [14].

Индекс эффективности защитных свойств рассчитывали как отношение значения ЛД₅₀ в опытной группе (группа иммунизированных инфицированных мышей) к значению ЛД₅₀ контрольной группы (группа неиммунизированных инфицированных мышей).

Результаты и обсуждение

Получение рекомбинантного белка FliC

С целью получения рекомбинантного флагеллина С *P. aeruginosa* полноразмерную последовательность гена *fliC* синтезировали с помощью ПЦР на основе матричной ДНК штамма *P. aeruginosa* PA-103. Прямой праймер (5'-GGA TCC GCC TTG ACC GTC AAC ACC AAC ATC G) имел дополнительный сайт рестрикции *Bam*HI, а обратный праймер (5'-AAG CTT AGC GCA GCA GGC TCA GAA CCG AC) — дополнительный сайт рестрикции *Hind*III, что было необходимо для встраивания в бактериальный экспрессионный плазмидный вектор pQE-30. С помощью ПЦР синтезировали амплификат с заданными размерами: чуть больше 1000 п.н. Этот амплификат включал ген *fliC* (без первого ATG кодона) с размером 1161 п.н. и два сайта рестрикции с размерами 6 п.н.

На первом этапе амплифицированный ген *fliC* клонировали, встраивая его в плазмиду pTZ57R с получением генно-инженерной конструкции pTZ57R-FliC. На следующем этапе ген *fliC* вырезали из промежуточной конструкции pTZ57R-FliC по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III, а затем по тем же сайтам рестрикции встраивали в плазмидный вектор pQE-30, предназначенный для регулируемой экспрессии в клетках *E. coli* штамма M15. В результате была получена рекомбинантная конструкция pQE-30-FliC (рис. 1), в которой целевой ген оказался под контролем модифицированного промотора бактериофага T5.

При электрофоретическом анализе белковых продуктов, полученных при культивировании клеток *E. coli* с конструкцией pQE-30-FliC после индукции экспрессии (добавление ИПТГ), был

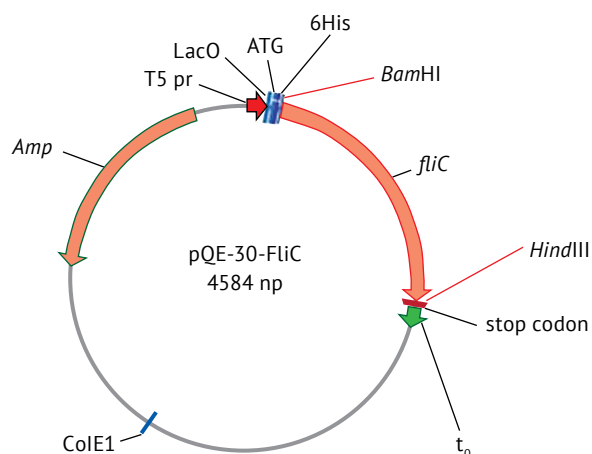


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Схема генно-инженерной конструкции pQE-30-FluC для синтеза рекомбинантного белка FluC. *Bam*HI, *Hind*III – сайты рестрикции; 6His – регион, кодирующий шесть гистидинов; ATG – стартовый кодон, кодирующий метионин; LacO – лактозный оперон; T5 pr – модифицированный промотор бактериофага T5; *Amp* – ген устойчивости к ампициллину; *t*₀ – регион остановки транскрипции; ColE1 – участок инициации плазмидной репликации; np – пар нуклеотидов; stop codon – стоп-кодон.

Fig. 1. Scheme of the engineered pQE-30-FluC construct for recombinant FluC production. *Bam*HI, *Hind*III, restriction sites; 6His, region encoding six histidine residues; ATG, start codon encoding methionine; LacO, lactose operon; T5 pr, modified T5 phage promoter; *Amp*, ampicillin resistance gene; *t*₀, transcription termination site; ColE1, plasmid origin of replication; np, nucleotide pairs.

идентифицирован рекомбинантный белок с молекулярной массой 40 кДа, что соответствовало расчетным данным (40,7 кДа) (рис. 2). На рисунке 3 представлена аминокислотная последовательность рекомбинантного белка FluC, рассчитанная исходя из результатов секвенирования.

Очистка рекомбинантного белка FluC

Очистка рекомбинантного белка флагеллина С включала два этапа. На первом этапе получали тельца включения, для чего биомассу, содержа-

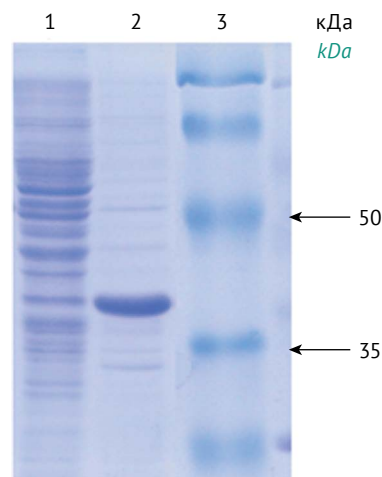


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Электрофореграмма образцов, полученных в результате экспрессии гена *fliC*, встроенного в плазмиду pQE-30 в клетках *E. coli* штамма M15. Дорожки на электрофореграмме: 1 – образец, содержащий белки из клеток штамма-продуцента FluC, полученные при наращивании биомассы продуцента в отсутствие индуктора (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид, ИПТГ); 2 – образец, содержащий белки штамма-продуцента FluC, полученные при наращивании биомассы в присутствии индуктора ИПТГ; 3 – маркер молекулярной массы белка (стрелками отмечены молекулярные массы двух маркерных белков).

Fig. 2. Electropherogram of samples resulting from the expression of the *fliC* gene sequence inserted into the pQE-30 plasmid in *E. coli* M15 cells. Electropherogram lanes: 1, proteins from the FluC-producing strain cells obtained while growing producer biomass without expression induction (without the addition of isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG); 2, proteins from the FluC-producing strain cells obtained with IPTG; 3, protein molecular weight markers (molecular weights of two markers are indicated with arrows).

щую целевой рекомбинантный продукт, подвергали ультразвуковой дезинтеграции и осаждали нерастворимую фракцию с помощью центрифугирования. При электрофоретическом анализе образца супернатанта было показано, что в нем в основном присутствовали белки клеток штамма-продуцента и не содержалось существенных количеств рекомбинантного белка FluC (рис. 4,

```
MRGSHHHHHHGSALTVNTNIASLNTQRNLNNSASLNTSLQRLSTGSRINSKDDAAGL
QIANRLTSQVGNLVATKNANDGISLAQTAEGALQQSTNQLQMRDLSLQSANGSNSDS
ERTALNGEVKQLQKELDRISNTTTFGGRKLLDGSFGVASFQVGSAAANEIISVGIDEMSAE
SLNGTYFTATGGGAVTAATASGTVDIAIGITGGSVNVKVDMMKGNETAEEQAAAKIAAA
VNDANVGIGAFTDGAQISYVSKASADGTTSAVSGVAITDTGSTGAGTAAGTTTTEAND
TVAKIDISTAKGAQSAVLVIDEAIKQIDAQRADLGAVQNRFDNTINNKLKNGENVSAARG
RIEDTDFAAETANLTKNQVLQAGTAILAQANQLPQSVLSLLR
```

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

Рис. 3. Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка FluC. Подчеркнута дополнительная последовательность, содержащая 6 гистидинов.

Fig. 3. Amino acid sequence of the recombinant FluC protein. The underscore marks the additional sequence of 6 histidines.

дорожка 1). Осадок ресуспендировали, подвергли ферментативной обработке РНКазой и ДНКазой с последующей с ультразвуковой дезинтеграцией и центрифугировали для получения осадка, содержащего FliC. При электрофоретическом анализе образца супернатанта было выявлено, что в нем также в основном присутствовали белки клеток штамма-производителя (рис. 4, дорожка 2). Для лучшего удаления примеси белков клеток штамма-производителя осадок ресуспендировали в отмывочном буфере с последующим центрифугированием. Полученный на этой стадии супернатант содержал незначительное количество целевого рекомбинантного продукта, но при этом происходило удаление большей части примесных белков (рис. 4, дорожка 3). В то же время осадок содержал тельца включения, состоящие в основном из рекомбинантного белка FliC (рис. 4, дорожка 4).

Для разработки оптимального метода очистки была проведена оценка растворимости рекомбинантного белка FliC, содержащегося в тельцах включения (рис. 5). Было установлено, что целевой рекомбинантный продукт тяжело поддавался растворению при инкубации в буфере с 8 М мочевиной. Так, через один час инкубации в буфере с мочевиной в режиме постоянного интенсивного перемешивания наблюдалось небольшое количество растворенного FliC. Через 12 ч в растворенное состояние переходила примерно половина рекомбинантного белка FliC

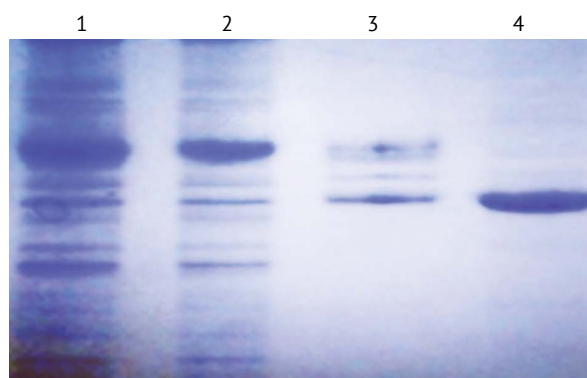


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Электрофореграмма образцов телец включения, содержащих рекомбинантный белок FliC с молекулярной массой 40 кДа. Дорожки на электрофореграмме: 1, 2, 3 – образцы супернатантов, полученных в процессе очистки телец включения; 4 – образец телец включения, содержащих рекомбинантный белок FliC.

Fig. 4. Electropherogram of inclusion body samples containing recombinant FliC with a molecular weight of 40 kDa. Electropherogram lanes: 1, 2, 3, supernatants obtained during the purification of inclusion bodies; 4, inclusion bodies containing recombinant FliC.

(рис. 5A). На следующем этапе проводилось исследование растворимости FliC из телец включения при инкубации в буфере, содержащем 6 М гуанидин гидрохлорид. Было показано, что через час инкубации половина рекомбинантного белка FliC перешла в растворимую форму, а через 12 ч наблюдалось его полное растворение (рис. 5B).

Супернатант, полученный после растворения рекомбинантного белка FliC из телец включения в буферном растворе, содержащем 6 М гуанидин гидрохлорид, использовали далее для проведения аффинной хроматографии с использованием никель-сефарозы. Однако применение данного метода очистки FliC оказалось неудачным, что, возможно, связано с высокой гидрофобностью белка. В связи с этим далее использовали альтернативный метод очистки рекомбинантного белка FliC. При разработке метода на первом этапе было проведено исследование растворимости FliC из телец включения в буфере, содержащем мочевины

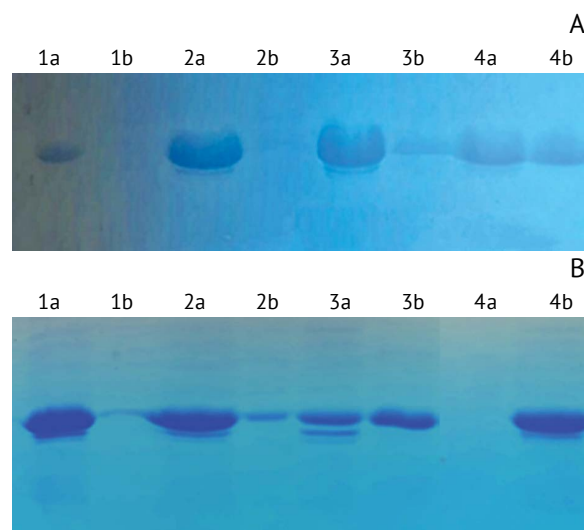


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Анализ растворимости рекомбинантного белка FliC из телец включения в буферных растворах (А – буфер, содержащий 8 М мочевины; В – буфер, содержащий 6 М гуанидина гидрохлорида) по данным электрофореза. Дорожки на электрофореграмме: 1, 2, 3, 4 – образцы, полученные при растворении рекомбинантного белка FliC из телец включения при инкубации в буферном растворе в течение 15 мин, 30 мин, 1 ч и 12 ч соответственно; а – образцы осадков после центрифугирования; б – образцы супернатантов после центрифугирования.

Fig. 5. Electrophoresis-based analysis of the solubility of recombinant FliC from inclusion bodies in buffer solutions (A, buffer containing 8 M urea; B, buffer containing 6 M guanidine hydrochloride). Electropherogram lanes: 1, 2, 3, 4, recombinant FliC from inclusion bodies that dissolved in buffer solutions after incubation for 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, and 12 hours, respectively; a, sediments after centrifugation; b, supernatants after centrifugation.

с разной концентрацией (8, 4 и 2 М). Инкубацию телец включения в этих условиях проводили в течение 30 мин. После инкубации осаждали нерастворимые компоненты с помощью центрифугирования. Было показано, что в описанных условиях инкубации весь рекомбинантный белок FliC оставался в нерастворимом состоянии (рис. 6).

Поскольку рекомбинантный белок FliC из телец включения не растворялся в буферном растворе мочевины, то это свойство было решено использовать для удаления примесей других белков, которые могут содержаться в тельцах включения. Для этого вначале тельца включения ресуспендировали в буферном растворе с 4 М мочевиной и инкубировали 30 мин (рис. 7, дорожка 1) с последующим центрифугированием. При этом, как было показано (рис. 7, дорожка 2), супернатант не содержал потерь целевого продукта. Далее FliC растворяли в течение 12 ч в буферном растворе с 6 М гуанидин гидрохлоридом с последующим центрифугированием и удалением нерастворимого осадка. Полученный супернатант, содержащий FliC (рис. 7, дорожка 4), подвергался диализу против 50 мМ Tris-HCl, pH 9,0. Степень чистоты рекомбинантного белка FliC составила 97,6%.

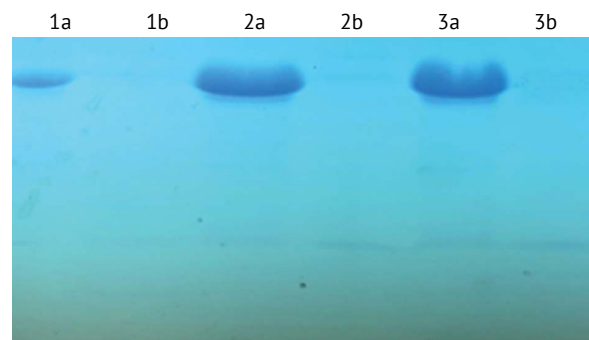


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 6. Анализ растворимости рекомбинантного белка FliC из телец включения в буферных растворах с различной концентрацией мочевины по данным электрофореза. Дорожки на электрофореграмме: 1, 2, 3 — образцы, полученные при растворении рекомбинантного белка FliC из телец включения при инкубации в буферном растворе, содержащем мочевины в концентрации 8 М, 4 М и 2 М соответственно; а — образцы осадков после центрифугирования; б — образцы супернатантов после центрифугирования.

Fig. 6. Electrophoresis-based analysis of the solubility of recombinant FliC from inclusion bodies in buffer solutions containing urea at different concentrations. Electropherogram lanes: 1, 2, 3, recombinant FliC from inclusion bodies that dissolved after incubation in buffer solutions containing urea at a concentration of 8 M, 4 M, and 2 M, respectively; a, sediments after centrifugation; b, supernatants after centrifugation.

Изучение иммунобиологических свойств рекомбинантного белка FliC

Очищенный рекомбинантный белок FliC использовали для иммунизации мышей, вводя препарат внутривенно двукратно с двухнедельным интервалом в дозе 50 мкг на одно животное. Также иммунизировали мышей смесью рекомбинантного белка FliC и поверхностного антигена *K. pneumoniae* в соотношении 1:1. Отдельной группе мышей (группа 3) вводили поверхностный антиген *K. pneumoniae*.

В образцах сыворотки крови иммунизированных мышей выявлены высокие титры специфических антител. Установлено, что в группе животных, которым вводили рекомбинантный белок FliC, титр антител составлял 1:512000. В сыворотках мышей, иммунизированных смесью рекомбинантного белка FliC и поверхностного антигена *K. pneumoniae*, титр антител соответствовал 1:128000. В сыворотках контрольных интактных (неиммунизированных) мышей титр

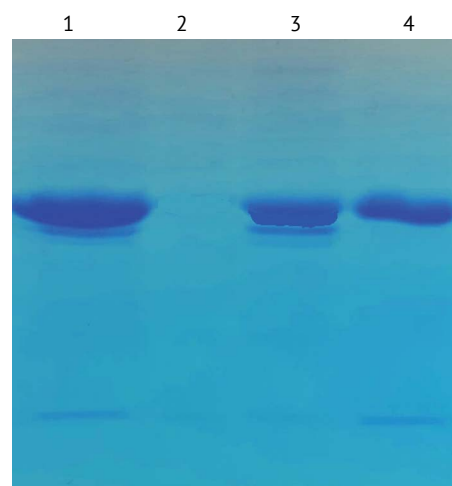


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 7. Электрофореграмма образцов при получении очищенного препарата рекомбинантного белка FliC. Дорожки на электрофореграмме: 1 — образец телец включения, ресуспендированных в буферном растворе с 4 М мочевиной; 2 — образец супернатанта после центрифугирования ресуспендированных в буферном растворе с 4 М мочевиной телец включения; 3 — образец телец включения после инкубации в буферном растворе с 6 М гуанидин гидрохлоридом; 4 — образец супернатанта, содержащего рекомбинантный белок FliC, после осаждения обработанных буферным раствором с 6 М гуанидин гидрохлоридом телец включения.

Fig. 7. Electropherogram of samples obtained during the purification of recombinant FliC. Electropherogram lanes: 1, inclusion bodies resuspended in buffer containing 4 M urea; 2, supernatant after centrifugation of inclusion bodies resuspended in buffer containing 4 M urea; 3, inclusion bodies after incubation in buffer containing 6 M guanidine hydrochloride; 4, supernatant containing recombinant FliC after precipitation of inclusion bodies treated with buffer containing 6 M guanidine hydrochloride.

антител составлял 1:100, что соответствовало фоновым значениям.

С целью оценки протективных и адъювантных свойств исследуемых антигенов проводили экспериментальное инфицирование мышей контрольных и опытных групп культурами *P. aeruginosa* PA-103 или *K. pneumoniae* № 204. Значение ЛД₅₀ для контрольной группы животных, инфицированных *P. aeruginosa*, составило 29,7 млн м.к., а для контрольной группы

животных, инфицированных *K. pneumoniae* — 35,0 млн м.к. (табл. 1, 2).

В группе мышей, иммунизированных рекомбинантным белком FliC и инфицированных *P. aeruginosa* (группа 1), значение ЛД₅₀ составило 91,7 млн м.к., а индекс эффективности соответствовал 3,1, что свидетельствовало о протективном эффекте в отношении *P. aeruginosa* (табл. 1). При исследовании адъювантных свойств рекомбинантного белка FliC показано,

Таблица 1. Протективные свойства рекомбинантного белка FliC при инфицировании мышей *P. aeruginosa* PA-103
Table 1. Protective properties of recombinant FliC in mice challenged with *P. aeruginosa* PA-103

Группа животных <i>Group of animals</i>	Доза заражения, млн м.к. <i>Challenge dose, mln m.c.</i>	Количество мышей, павших/всего <i>Number of mice, died/total</i>	ЛД ₅₀ , млн м.к. <i>LD₅₀, mln m.c.</i>	ИЭ <i>EI</i>
Группа 1. Мыши, иммунизированные рекомбинантным белком FliC <i>Group 1. Animals immunised with recombinant FliC</i>	200 100 50 25 12,5	7/8 5/8 1/8 0/8 0/8	91,7 (60,3–147,9)	3,1
Группа 2. Мыши, иммунизированные рекомбинантным белком FliC и поверхностным антигеном <i>K. pneumoniae</i> <i>Group 2. Animals immunised with recombinant FliC and the surface antigen of K. pneumoniae</i>	200 100 50 25 12,5	4/8 2/8 0/8 0/8 0/8	154,0 (117,5–354,8)	5,6
Группа 5. Контроль (неиммунизированные мыши) <i>Group 5. Control animals (non-immunised mice)</i>	100 50 25 12,5 6,25	8/8 6/8 3/8 1/8 0/8	29,7 (19,5–44,7)	–

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

Примечание. ЛД₅₀ — доза, вызывающая гибель 50% экспериментальных животных; ИЭ — индекс эффективности; м.к. — микробные клетки.

Note. LD₅₀, dose causing the death of 50% of test animals; EI, efficacy index; m.c., microbial cells.

Таблица 2. Протективные свойства рекомбинантного белка FliC при инфицировании мышей *K. pneumoniae* № 204
Table 2. Protective properties of recombinant FliC in mice challenged with *K. pneumoniae* 204

Группа животных <i>Group of animals</i>	Доза заражения, млн м.к. <i>Infection dose, mln m.c.</i>	Количество мышей, павших/всего <i>Number of mice, died/total</i>	ЛД ₅₀ , млн м.к. <i>LD₅₀, mln m.c.</i>	ИЭ <i>EI</i>
Группа 3. Мыши, иммунизированные поверхностным антигеном <i>K. pneumoniae</i> <i>Group 3. Animals immunised with the surface antigen of K. pneumoniae</i>	200 100 50 25 12,5	4/8 3/8 2/8 0/8 0/8	129,6 (85,1–223,9)	3,6
Группа 4. Мыши, иммунизированные рекомбинантным белком FliC и поверхностным антигеном <i>K. pneumoniae</i> <i>Group 4. Animals immunised with recombinant FliC and the surface antigen of K. pneumoniae</i>	200 100 50 25 12,5	2/8 1/8 0/8 0/8 0/8	218,0 (166,0–501,2)	6,1
Группа 6. Контроль (неиммунизированные мыши) <i>Group 6. Control animals (non-immunised mice)</i>	100 50 25 12,5 6,25	8/8 5/8 3/8 0/8 0/8	35,0 (25,1–50,1)	–

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

Примечание. ЛД₅₀ — доза, вызывающая гибель 50% экспериментальных животных; ИЭ — индекс эффективности; м.к. — микробные клетки.

Note. LD₅₀, dose causing the death of 50% of test animals; EI, efficacy index; m.c., microbial cells.

что он способствовал усилению защитных свойств поверхностного антигена *K. pneumoniae* при экспериментальном инфицировании *K. pneumoniae* мышей, иммунизированных комбинацией FliC + поверхностный антиген *K. pneumoniae* (группа 4). Значение ЛД₅₀ в этой группе составило 218,0 млн м.к. (индекс эффективности – 6,1), в то время как при иммунизации только поверхностным антигеном *K. pneumoniae* (группа 3) значение ЛД₅₀ было равно 129,6 млн м.к. (индекс эффективности – 3,6) (табл. 2). Следует отметить, что поверхностный антиген *K. pneumoniae* также способствовал усилению протективного эффекта рекомбинантного белка FliC в группе мышей, инфицированных *P. aeruginosa* (группа 2), – сочетанная иммунизация приводила к увеличению значения ЛД₅₀, которое составило 154,0 (индекс эффективности – 5,6) (табл. 1).

Поскольку рекомбинантный белок FliC был синтезирован в клетках *E. coli*, то конечный продукт мог содержать примесь бактериальных эндотоксинов, в частности липополисахарида (ЛПС) клеточной стенки бактерий *E. coli*. Известно, что ЛПС способен активировать TLR4, проявляя адъювантные свойства и повышая уровень иммунного ответа [15]. Для оценки содержания эндотоксина в препарате рекомбинантного белка FliC проводили определение его концентрации с использованием ЛАЛ-теста. В результате исследования было показано, что содержание эндотоксина в препарате составило 390 ЕЭ/мл (в одной иммунизирующей дозе – 19,5 ЕЭ/мл). Согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации³ значение пороговой пирогенной дозы составляет не более

5 ЕЭ/кг/ч, что позволяет применять препарат рекомбинантного белка FliC (в дозе 0,5 мл) у пациентов с массой тела от 2 кг. В то же время следует отметить, что в препарате поверхностного антигена *K. pneumoniae*, содержащего ЛПС [16], который проявлял адъювантные свойства, содержание эндотоксина было более чем 39 000 ЕЭ/мл.

Заключение

В результате проведенных исследований получен штамм-продуцент рекомбинантного белка флагеллина С (FliC) *P. aeruginosa*. Разработан оригинальный метод очистки белка, который включал в себя несколько последовательных этапов: получение телец включения, удаление примесей с использованием буферных растворов мочевины и гуанидин гидрохлорида, диализ. Степень чистоты FliC составила 97,6%.

Полученный рекомбинантный белок FliC *P. aeruginosa* обладал протективной активностью в случае заражения мышей *P. aeruginosa*, а также проявлял адъювантные свойства при сочетанной иммунизации с поверхностным антигеном *K. pneumoniae*, увеличивая его иммуногенность у мышей, инфицированных *K. pneumoniae*.

Таким образом, разработка вакцины на основе рекомбинантной формы флагеллина С является перспективным подходом для иммунопрофилактики *P. aeruginosa*. В этой связи важным представляется дальнейшая оптимизация подходов, направленных на удаление из препарата рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* остаточной примеси ЛПС, а также исследование его адъювантных свойств при совместном применении с другими антигенами.

Литература/References

1. Колесова ТС. Этиологическая роль синегнойной палочки при различных оппортунистических и внутрибольничных инфекциях. *Современная медицина: актуальные вопросы*. 2017;(3):134–40. Kolesova TS. The causation of blue pus bacillus under different opportunist and hospital-acquired infections. *Modern Medicine: Topical Issues*. 2017;(3):134–40 (In Russ.). EDN: YHZVON
2. Лазарева АВ, Чеботарь ИВ, Крыжановская ОА, Чеботарь ВИ, Маянский НА. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015;17(3):170–86. Lazareva AV, Chebotar IV, Kryzhanovskaya OA, Chebotar VI, Mayansky NA. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity, pathogenesis and diseases. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;17(3):170–86 (In Russ.). EDN: UHPUWP
3. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019;37(1):177–92. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
4. Карпунина ТИ, Кузнецова МВ, Николаева НВ, Демаков ВА. Эпидемиологические аспекты нозокомиальной синегнойной инфекции в многопрофильном хирургическом стационаре. *Сибирский медицинский журнал*. 2009;24(4–1):70–3. Karpunina TI, Kuznetsova MV, Nikolaeva NV, Demakov TA. Epidemiological aspects of nosocomial *Pseudomonas*-based infection in multi-type surgical hospital. *Siberian Medical Journal*. 2009;24(4–1):70–3 (In Russ.). EDN: KZFTAP
5. Parkins MD, Somayaji R, Waters VJ. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):e00019–18. <https://doi.org/10.1128/cmr.00019-18>

³ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

6. Nedeljković M, Sastre DE, Sundberg EJ. Bacterial flagellar filament: a supramolecular multifunctional nanostructure. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7521. <https://doi.org/10.3390/ijms22147521>
7. Hajam IA, Dar PA, Shah Nawaz I, Jaume JC, Lee JH. Bacterial flagellin – a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med.* 2017;49(9):e373. <https://doi.org/10.1038/emmm.2017.172>
8. Духовлинов ИВ, Богомолова ЕГ, Федорова ЕА. и др. Исследование протективной активности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8. *Медицинская иммунология.* 2016;18(5):417–24. Dukhovlinov IV, Bogomolova EG, Fedorova EA. Protective activity study of a candidate vaccine against rotavirus infection based on recombinant protein FliCVP6VP8. *Medical Immunology.* 2016;18(5):417–24 (In Russ.). <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-417-424>
9. Софронов ГА, Мурзина ЕВ, Болехан ВН, Веселова ОМ, Симбирцев АС. Перспективные направления использования препаратов на основе рекомбинантного флагеллина. *Медицинский академический журнал.* 2017;17(2):7–20. Sofronov GA, Murzina EV, Bolekhan VN, Veselova OM, Simbirtsev AS. Perspective direction of using flagellin-based drugs. *Medical Academic Journal.* 2017;17(2):7–20 (In Russ.). EDN: [WUERXU](#)
10. Cui B, Liu X, Fang Y, Zhou P, Zhang Y, Wang Y. Flagellin as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines.* 2018;17(4):335–49. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1457443>
11. Felgner S, Spöring I, Pawar V, Kocijancic, Preusse M, Falk C, Rohde M, et al. The immunogenic potential of bacterial flagella for *Salmonella*-mediated tumor therapy. *Int J Cancer.* 2020;147(2):448–60. <https://doi.org/10.1002/ijc.32807>
12. Егорова НБ, Курбатова ЕА, Ахматова НК, Грубер ИМ. Поликомпонентная вакцина Иммуно-вак-ВП-4 и иммуно-терапевтическая концепция ее использования для профилактики и лечения заболеваний, вызываемых условно патогенными микроорганизмами. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2019;96(1):43–9. Egorova NB, Kurbatova EA, Akhmatova NK, Gruber IM. Polycapponent vaccine Immunovac-VP-4 and immunotherapeutic concept of its use for the prevention and treatment of diseases caused by opportunistic microorganisms. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2019;96(1):43–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-43-49>
13. Калашин АА, Жеребцов АП, Михайлова НА. Рекомбинантная плазмидная ДНК PPA-FLICC, кодирующая синтез рекомбинантного флагеллина-С *Pseudomonas aeruginosa*, штамм *Escherichia coli* PA-FLICC – продуцент гибридного рекомбинантного белка и способ получения указанного белка. Патент Российской Федерации № 2793753; 2023. Kaloshin AA, Zharebtsov AP, Mikhailova NA. Recombinant plasmid DNA pPA-FliC encoding synthesis of recombinant flagellin-C *Pseudomonas aeruginosa*, strain *Escherichia coli* PA-FliC – producer of the hybrid recombinant protein and a method for producing said protein. Patent of the Russian Federation No. 2793753; 2023 (In Russ.). EDN: [RAOQAM](#)
14. Ашмарин ИП, Воробьев АА. *Статистические методы в микробиологических исследованиях.* Л.: Медгиз; 1962. Ashmarin IP, Vorobiev AA. *Statistical methods in microbiological research.* Leningrad: Medgiz; 1962 (In Russ.).
15. Xu SF, Wang P, Liang ZX, Sun JP, Zhao XW, Li AM, Chen LA. Investigation of inflammatory responses of pulmonary microvascular endothelial cells induced by lipopolysaccharide and mechanism. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2011;34(11):816–20 (In Chinese.). PMID: 22333467.
16. Follador R, Heinz E, Wyres KL, Ellington MJ, Kowarik M, Holt KE, Thomson NR. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb Genom.* 2016;2(8):e000073. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000073>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.П. Жеребцов** – отбор клонов штамма-продуцента; культивирование клеток-продуцентов; отработка методов очистки рекомбинантного белка FliC; участие в экспериментах по иммунизации животных и оценке иммунобиологических свойств FliC; сбор и анализ результатов исследования; анализ и обобщение данных литературы; статистическая обработка данных; написание, редактирование, оформление текста рукописи; работа с графическим материалом; **А.А. Калашин** – разработка дизайна и концепции экспериментального исследования (формулирование идеи, исследовательских целей и задач); анализ баз данных с подбором праймеров для ПЦР; синтез и клонирование рекомбинантного гена *fliC*; участие в отработке методов очистки рекомбинантного белка FliC; интерпретация результатов исследования;

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.P. Zharebtsov** selected producer strain clones; cultivated producer-cells; refined recombinant FliC purification methods; participated in animal immunisation experiments and immunological characterisation of the recombinant protein; collected and analysed the study results; analysed and summarised literature data; carried out statistical data analysis; drafted, edited, and formatted the manuscript; and worked with the graphical material. **A.A. Kaloshin** designed and conceptualised the experimental research (formulated the idea, aims, and objectives), analysed databases and selected PCR primers; synthesised and cloned the recombinant *fliC* gene; participated in refining the methods for recombinant FliC purification; interpreted the study results; drafted, edited, and formatted the manuscript; and worked with the graphical material.

написание, редактирование и оформление текста рукописи; работа с графическим материалом; **Н.А. Михайлова** — разработка дизайна и концепции экспериментального исследования (формулирование идеи, исследовательских целей и задач); критический пересмотр содержания текста; утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен Локальным советом по этике при ФГБНУ НИИВС имени И.И. Мечникова (протокол учреждения № 7 от 29.09.2022).

N.A. Mikhailova designed and conceptualised the experimental research (formulated the idea, aims, and objectives), critically revised the manuscript, and approved the final version for publication.

Ethics approval. The animal study protocol was approved by the Local Ethics Council at the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Institution Protocol No. 7 dated 29 September 2022).

Об авторах / Authors

Жеребцов Антон Павлович

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-1676-9515>

antonzherebtsov@yandex.ru

Калошин Алексей Алексеевич, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8679-2421>

alex-k-1973@yandex.ru

Михайлова Наталья Александровна, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6652-2093>

n_mikhailova@inbox.ru

Поступила 07.09.2023

После доработки 16.01.2024

Принята к публикации 29.02.2024

Anton P. Zherebtsov

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-1676-9515>

antonzherebtsov@yandex.ru

Alexey A. Kaloshin, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8679-2421>

alex-k-1973@yandex.ru

Natalia A. Mikhailova, Dr. Sci. (Med.),

Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6652-2093>

n_mikhailova@inbox.ru

Received 7 September 2023

Revised 16 January 2024

Accepted 29 February 2024

УДК 579.61:578.7

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-103-116>

Научная статья | Scientific article



Выделение новых бактериофагов *Actinomyces oris* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и исследование их биологических характеристик *in vitro*

Т.А. Кочетова[✉], В.В. Юскевич, Ф.М. Зурабов, Г.Т. Садикова, П.В. Медведев, В.М. Попова

ООО НПЦ «Микромир», Кисельный Нижний пер., д. 5/23, стр. 1, Москва, 107031, Российская Федерация

✉ Кочетова Татьяна Андреевна; kochetova@micromir.bio

РЕЗЮМЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ. В связи с увеличением числа случаев возникновения инфекций пародонта, вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами бактерий *Actinomyces oris* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, способными формировать биопленки в полости рта, и недостаточной эффективностью противомикробных препаратов в борьбе с биопленками, актуальной задачей представляется выделение бактериофагов, активных в отношении данных бактерий.

ЦЕЛЬ. Выделение бактериофагов, активных в отношении *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Actinomyces oris*, изучение их биологических свойств и подбор оптимальных параметров культивирования системы «фаг–клетка» для получения чистых линий бактериофагов с высокими титрами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Бактериофаги выделяли из биообразцов слюны, зубного налета и содержимого пародонтального кармана и определяли их характеристики: оптимальные значения множественности инфекции, время культивирования системы «фаг–клетка», устойчивость к различным температурам и pH, стабильность при хранении. Морфологию фагов изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Морфологию негативных колоний, литическую активность, спектр хозяев и специфичность оценивали, используя спот-тестирование и метод Грация. В работе использовали бактерии из коллекции штаммов НПЦ «Микромир».

РЕЗУЛЬТАТЫ. Выделены и изучены биологические свойства трех новых изолятов бактериофагов, активных в отношении *A. oris* (vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, vB_AorP_3/Bl-35), и бактериофага, активного в отношении *Ag. actinomycetemcomitans* (vB_AaS_1/Dc-1). Фаги бактерий *A. oris* отнесены к подовирусам, а бактериофаг vB_AaS_1/Dc-1 – к сифовирусам. Фаги образуют полностью прозрачные бляшки округлой формы без ореола, диаметром от $0,8 \pm 0,1$ до $4,0 \pm 0,2$ мм. Установлено, что для получения чистых линий фагов с максимальными значениями титра оптимальными являются следующие параметры: значение множественности инфекции – 0,1–10, время культивирования системы «фаг–клетка» – 8–12 ч. Выявлена способность бактериофагов *A. oris* лизировать штаммы *Actinomyces naeslundii*. Из 15 исследуемых штаммов *A. oris*, бактериофаги vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, vB_AorP_3/Bl-35 лизировали 10, 8 и 12 бактериальных штаммов соответственно, а изолят фага vB_AaS_1/Dc-1 проявлял литическую активность в отношении обоих тестируемых штаммов *Ag. actinomycetemcomitans*. Исследуемые фаги продемонстрировали стабильность при абиотическом стрессе и длительном хранении.

ВЫВОДЫ. Выделены три новых бактериофага, активных в отношении *A. oris*, и один бактериофаг, активный в отношении *Ag. actinomycetemcomitans*, а также изучены их биологические свойства. Выделенные бактериофаги являются перспективными для дальнейших

научных исследований на клинических штаммах, а также для проведения полногеномного секвенирования.

Ключевые слова: бактериофаги; *Actinomyces oris*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; заболевания пародонта; пародонтальные инфекции; биопленка; фаготерапия; фагопрофилактика; множественность инфекции; MOI; литическая активность

Для цитирования: Кочетова Т.А., Юскевич В.В., Зурабов Ф.М., Садикова Г.Т., Медведев П.В., Попова В.М. Выделение новых бактериофагов *Actinomyces oris* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и исследование их биологических характеристик *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):103–116. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-103-116>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

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

Isolation of novel *Actinomyces oris* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bacteriophages and study of their biological characteristics *in vitro*

Tatiana A. Kochetova✉, Victoria V. Yuskevich, Fedor M. Zurabov, Gulnur T. Sadykova, Pavel V. Medvedev, Valentina M. Popova

Research and Production Centre Micromir, LLC, 5/23 Bldg. 1, Nizhny Kiselny Ln., Moscow 107031, Russian Federation

✉ Tatiana A. Kochetova; kochetova@micromir.bio

ABSTRACT

SCIENTIFIC RELEVANCE. The incidence of periodontal infections with antibiotic-resistant strains of *Actinomyces oris* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* capable of forming biofilms in the oral cavity is increasing, and the effectiveness of antimicrobials against biofilms is insufficient. Therefore, the isolation of bacteriophages active against *A. oris* and *Ag. actinomycetemcomitans* is an urgent task.

AIM. This study aimed to isolate bacteriophages active against *A. oris* and *Ag. actinomycetemcomitans*, study their biological properties, and select optimum culture conditions providing pure lines and high titres of bacteriophages.

MATERIALS AND METHODS. Bacteriophages were isolated from biosamples of saliva, dental plaque, and periodontal pocket contents. The study determined bacteriophage characteristics, including the optimum multiplicity of infection, phage–cell system cultivation time, resistance to various temperatures and pH, and storage stability. Bacteriophage morphology was studied using transmission electron microscopy. Negative colony morphology, lytic activity, host range, and specificity were assessed using spot testing and the Gratia method. Bacterial strains were obtained from the strain collection of the Micromir research and production centre.

RESULTS. The authors isolated and studied 3 novel bacteriophages active against *A. oris* (vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, and vB_AorP_3/Bl-35) and 1 bacteriophage active against *Ag. actinomycetemcomitans* (vB_AacS_1/Dc-1). The *A. oris* bacteriophages were classified as podoviruses, and the vB_AacS_1/Dc-1 bacteriophage was classified as a siphovirus. The phages formed completely transparent round plaques without a halo, with a diameter ranging from 0.8±0.1 to 4.0±0.2 mm. The optimum parameters established to obtain pure phages with maximum titres included a multiplicity of infection of 0.1–10 and phage–cell system cultivation time of 8–12 hours. The study demonstrated the ability of *A. oris* bacteriophages to lyse *Actinomyces naeslundii* strains. Of the 15 *A. oris* bacteriophage strains studied, vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, and vB_AorP_3/Bl-35 lysed 10, 8, and 12 bacterial strains, respectively. The vB_AacS_1/Dc-1 phage isolate exhibited lytic activity against both tested strains of *Ag. acti-*

nomycetemcomitans. The studied phages demonstrated stability under abiotic stress and long-term storage conditions.

CONCLUSIONS. The authors isolated 3 novel bacteriophages active against *A. oris* and 1 bacteriophage active against *Ag. actinomycetemcomitans* and studied their biological properties. The isolated bacteriophages are promising as candidates for further research using clinical strains and whole-genome sequencing.

Keywords: bacteriophages; *Actinomyces oris*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; periodontal diseases; periodontal infections; biofilm; phage therapy; phage prophylaxis; multiplicity of infection; MOI; lytic activity

For citation: Kochetova T.A., Yuskevich V.V., Zurabov F.M., Sadykova G.T., Medvedev P.V., Popova V.M. Isolation of novel *Actinomyces oris* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bacteriophages and study of their biological characteristics *in vitro*. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):103–116. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-103-116>

Funding. The study was performed without external funding.

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

Введение

Микробиом ротовой полости включает от нескольких сотен до нескольких тысяч разнообразных видов микроорганизмов [1–3]. Сообщество микроорганизмов, обитающих в полости рта, характеризуется вариабельностью и уникальностью для разных индивидуальных [3]. Микробная колонизация патогенной и условно-патогенной микрофлорой и связанное с ней образование биопленки представляют серьезную проблему, влияющую на качество жизни и системное здоровье человека, так как способствуют развитию различных воспалительных заболеваний пародонта, вплоть до разрушения коллагеновых волокон, которые поддерживают зуб в альвеолярной кости [3–6]. Формирование биопленки на искусственных стоматологических поверхностях может привести к воспалению и разрушению мягких и твердых тканей, окружающих зубные имплантаты, коронки или протезы [3, 6]. В связи с увеличением числа случаев возникновения пародонтальных инфекций, вызванных лекарственно-устойчивыми штаммами, и недостаточной эффективностью противомикробных препаратов в борьбе с биопленками, актуально использование антибактериальных препаратов на основе бактериофагов [4, 6, 7]. Основные преимущества фаготерапии: специфичность бактериофагов к определенному виду бактерий, способность лизировать антибиотико-устойчивые микроорганизмы, безопасность, отсутствие ущерба нормофлоре, а также эффективность в отношении не только бактерий

в планктонном состоянии, но и бактерий в виде биопленки¹ [4, 6–8].

Бактерии *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Actinomyces oris*, способные формировать биопленку, являются одними из многих этиологических факторов заболеваний пародонта [1, 6, 9–13]. *A. oris* – грамположительный факультативно-анаэробный микроорганизм, ранний колонизатор в развитии биопленок полости рта, был идентифицирован при инфекциях корневых каналов, актиномикозах и периимплантите [1, 2, 9–11, 14, 15]. Основным патоген пародонта – *Ag. actinomycetemcomitans* – является поздним колонизирующим микроорганизмом, который выделялся при запущенных формах заболеваний пародонта, таких как локализованный агрессивный периодонтит, а также в полости рта здоровых людей [1, 4, 5, 12, 16–18]. *Ag. actinomycetemcomitans* – грамотрицательный факультативно-анаэробный патобионт полости рта, для жизнедеятельности которому требуется от 5 до 10% диоксида углерода [12, 13, 18]. Установлена роль *Ag. actinomycetemcomitans* и *A. oris* в развитии воспалительных заболеваний полости рта [4, 5], в связи с чем приоритетной задачей является выделение бактериофагов против данных микроорганизмов.

Цель работы – выделение бактериофагов, активных в отношении *Ag. actinomycetemcomitans* и *A. oris*, изучение их биологических свойств и подбор оптимальных параметров культивирования системы «фаг–клетка» для получения чистых линий бактериофагов с высокими значениями титра.

¹ Зайцев АВ, Зурабов АЮ, Говоров АВ, Васильев АО, Арефьева ОА, Зурабов ФМ и др. Бактериофаги в урологии: методические рекомендации. М.: АБВ-пресс; 2022.

Материалы и методы

Материалы

Штаммы бактерий и условия роста. Клинические изоляты *A. oris* G-12, *A. oris* Ch-28, *A. oris* BL-35, *Ag. actinomycetemcomitans* Dc-1, использованные в данном исследовании, были получены из рабочей коллекции штаммов НПЦ «Микромир» (Россия). Подтверждение видовой (штаммовой) принадлежности изолятов проводили с использованием микроскопического, бактериологического, биохимического и масс-спектрометрического методов идентификации микроорганизмов.

Штаммы бактерий проверяли на наличие фагов индукцией ультрафиолетовым излучением [19], а также без воздействия индуцирующего фактора по методике, предложенной С. Лурией и Д. Дарнеллом [20]. Штаммы, проявляющие лизогенные свойства, выбраковывали.

Штаммы *A. oris* культивировали в течение 18–22 ч на BHI агаре (HiMedia Laboratories, Индия) или в BHI бульоне (HiMedia Laboratories, Индия) при температуре 37 °С в термостате (Binder, Германия).

Штаммы *Ag. actinomycetemcomitans* культивировали в течение 18–22 ч на BHI агаре или в BHI бульоне в атмосфере 10% углекислого газа в инкубаторе MCO-175 (SANYO, Япония) при температуре 37 °С.

Бактериофаги. Для выделения бактериофагов и проведения экспериментов использовали штаммы: *A. oris* G-12, *A. oris* Ch-28, *A. oris* BL-35, *Ag. actinomycetemcomitans* Dc-1. Эти штаммы представляют наиболее удобными для производства бактериофагов и обладают наибольшей чувствительностью. Для каждого бактериофага использовали отдельный штамм: *A. oris* G-12 для vB_AorP_1/G-12, *A. oris* Ch-28 для vB_AorP_2/Ch-28, *A. oris* BL-35 для vB_AorP_3/BL-35 и *Ag. actinomycetemcomitans* Dc-1 для vB_AacS_1/Dc-1. Выделенные фаги были названы в соответствии с предложенной А.М. Kropinski с соавт. [21] системой наименований.

Методы

Выделение бактериофагов. Выделение бактериофагов и изучение их биологических свойств проводили методами, предложенными М. Адамсом [22] и Д.М. Гольдфарбом [23]. Образцы биоматериала из ротовой полости (слюна, зубной налет и содержимое пародонтального кармана) использовались в качестве источника для выделения фагов, специфичных к изолированным штаммам *A. oris* и *Ag. actinomycetemcomitans*.

Образцы биоматериала центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 мин на центрифуге Avanti J-E (Beckman Coulter, США) для удаления бактериальных клеток и крупных частиц [23]. Супернатант отделяли от осадка и фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор – 1,2; 0,45; 0,22 мкм (Sartorius, Германия).

Бактериофаги выделяли, используя метод обогащения «с подсевом»². К 10 мл разлитого по пробиркам BHI бульона добавляли 1 мл культур *A. oris* и *Ag. actinomycetemcomitans* (10⁸ КОЕ/мл), взятых в экспоненциальной фазе роста. Одновременно в пробирки вносили 10 мл ранее приготовленного фильтрата и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч для получения обогащенного фагового лизата [23]. В общей сложности для процедуры обогащения использовали 12 штаммов (10 штаммов *A. oris* и 2 штамма *Ag. actinomycetemcomitans*). После периода обогащения смеси центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 мин на центрифуге Avanti J-E (Beckman Coulter, США). Супернатант отделяли от осадка и центрифугировали на ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, США) при 27000 об/мин в течение 120 мин. Осадок ресуспендировали в 0,05 М трис-HCl буфере (pH 7,0–7,2) и фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор – 1,2; 0,45; 0,22 мкм (Sartorius, Германия). Подтверждение наличия фагов в обогащенном лизате проводили путем точечного нанесения фильтрата фагов на бактериальный газон исследуемых культур (спот-тест) [24]. При обнаружении лизиса культуры в месте нанесения капли фильтрата бактериофагов или появлении в этом участке мелких стерильных пятен фаговые лизаты продолжали исследовать, используя метод агаровых слоев по Грация [22, 23].

Получение чистых линий бактериофагов. Для получения чистых линий бактериофагов отбирали единичную хорошо изолированную бляшку с помощью стерильного наконечника микропипетки. Бляшку помещали в 5 мл BHI бульона одновременно с чувствительной культурой в экспоненциальной фазе роста и обогащали в течение 24 ч [23]. Данную процедуру повторяли три раза для получения морфологически однородных негативных колоний с последующей стерилизующей фильтрацией. Чистые линии бактериофагов помещали в стерильные пробирки и хранили для дальнейших исследований при 4 °С.

Оценка морфологии негативных колоний бактериофага. Метод агаровых слоев по Грация

² Лабинская АС, Блинкова ЛП, Ешина АС, ред. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учебное пособие. М.: Медицина; 2004.

использовали для исследования морфологии бляшек фагов, активных в отношении *A. oris* и *Ag. actinomycetemcomitans* [22, 23]. В пробирки с ВНИ агаром (0,4%) добавляли по 1,0 мл разведенный титруемого бактериофага и по 0,1 мл бактериальной суспензии, затем высевали на предварительно подготовленные чашки с ВНИ агаром (1,5%). Морфологию бляшек изучали после инкубирования в течение 18–22 ч в условиях роста микроорганизмов, описанных ранее.

Электронная микроскопия. Морфологию вирионов исследовали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Каплю очищенных фагов с титром 10^9 бляшкообразующих единиц в 1 мл фаголизата (БОЕ/мл) наносили на медную подложку с последующим отрицательным окрашиванием 2% водным раствором уранилацетата (рН 3,0) и исследовали с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, Япония). Электронные микрофотографии были сделаны с помощью установленной на микроскоп камеры Erlangshen ES500W (Gatan, США). Оценку морфологических параметров бактериофагов проводили с использованием программы ImageJ³.

Определение оптимального значения множественности инфекции. Оптимальное значение множественности инфекции (multiplicity of infection, MOI) [25] для бактериофагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 и vB_AorP_3/Bl-35 устанавливали с использованием термостата (Binder, Германия) при температуре 37 °С и в условиях анаэробной станции Whitley A35 (Don Whitley Scientific, Великобритания), предусматривающих замещение воздуха специальной бескислородной газовой смесью (N_2 – 80%, CO_2 – 10%, H_2 – 10%) при 37 °С. Показатель MOI фага vB_AacS_1/Dc-1 определяли в атмосфере 10% углекислого газа в CO_2 инкубаторе MCO-175 (SANYO, Япония) при 37 °С. Штаммы-хозяева *A. oris* G-12, *A. oris* Ch-28, *A. oris* Bl-35 и *Ag. actinomycetemcomitans* Dc-1 культивировали в ВНИ бульоне до ранней фазы экспоненциального роста – 10^8 КОЕ/мл. Шесть различных концентраций бактериофагов были добавлены в жидкую питательную среду к штаммам-хозяевам для формирования множественности инфекции – 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 БОЕ/КОЕ [25]. После просветления пробирок образцы отбирали, а титр фагов определяли, используя метод Грация [22, 23]. Анализ проводили в трех отдельных испытаниях и рассчитывали средние значения титров фагов, полученные на каждом этапе эксперимента.

Определение оптимального времени культивирования. Оптимальное время культивирования [25] фагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 на соответствующих тест-штаммах *A. oris* G-12 и *A. oris* Ch-28 устанавливали при значении MOI, равном 1, в условиях анаэробной станции Whitley A35 при температуре 37 °С. Для фага vB_AorP_3/Bl-35 оптимальное время культивирования определяли на тест-штамме *A. oris* Bl-35 при значении MOI, равном 10, в условиях анаэробной станции Whitley A35 при 37 °С, а для фага vB_AacS_1/Dc-1 – на тест-штамме *Ag. actinomycetemcomitans* Dc-1 при MOI 0,1 в атмосфере 10% углекислого газа в CO_2 инкубаторе при 37 °С. Опытным путем находили оптимальное соотношение между временем культивирования и активностью фагов [25]. Для этого каждые 2 ч отбирали образец для определения титра фага по методу Грация [22, 23]. Изучаемый диапазон составил 12 ч. Анализ проводили в трех повторностях.

Определение спектра литической активности фагов. Литический спектр бактериофагов исследовали на 15 тест-культурах *A. oris* и 2 тест-культурах *Ag. actinomycetemcomitans* методом спот-тестирования [24].

Определение специфичности бактериофагов. Специфичность бактериофагов, активных в отношении *A. oris*, изучали методом спот-тестирования культур родственных видов [24]: *A. naeslundii*, *A. canis*, *A. georgiae*, *A. graevenitzi*, *A. israelii*, *A. neuui*, *A. odontolyticus*, *A. meyeri*, *A. weissii*. Штаммы получены из коллекции микроорганизмов НПЦ «Микромир» (Россия).

Чувствительность фагов к температуре и рН. Температурную устойчивость выделенных бактериофагов определяли по изменению количества жизнеспособных фаговых частиц после инкубации в твердотельном термостате «Термит» («ДНК-Технология», Россия) при различных температурах (4, 25, 37, 50, 60, 70, 80 и 90 °С) в течение 1 ч [26]. Контрольные пробирки не прогревали. Количество оставшихся фаговых частиц определяли, используя метод Грация [22, 23]. Исследование проводили в трех повторностях.

В ходе экспериментов по изучению чувствительности фагов к различным значениям рН среды фаговые фильтраты инкубировали в буферных растворах с различными значениями рН (2, 4, 7 и 11) при 25 °С в течение 1 ч [24]. Количество оставшихся фаговых частиц определяли, используя метод Грация [22, 23].

Стабильность фаголизатов при длительном хранении. Стабильность фаголизатов,

³ <https://imagej.net/ij/>

хранящихся при температуре 4 °С, изучали путем отслеживания изменения титра фагов после 6 мес. хранения [27] с применением метода титрования по Грациа.

Статистическая обработка данных.

Полученные результаты обрабатывали с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel, рассчитывая среднее арифметическое и стандартную ошибку.

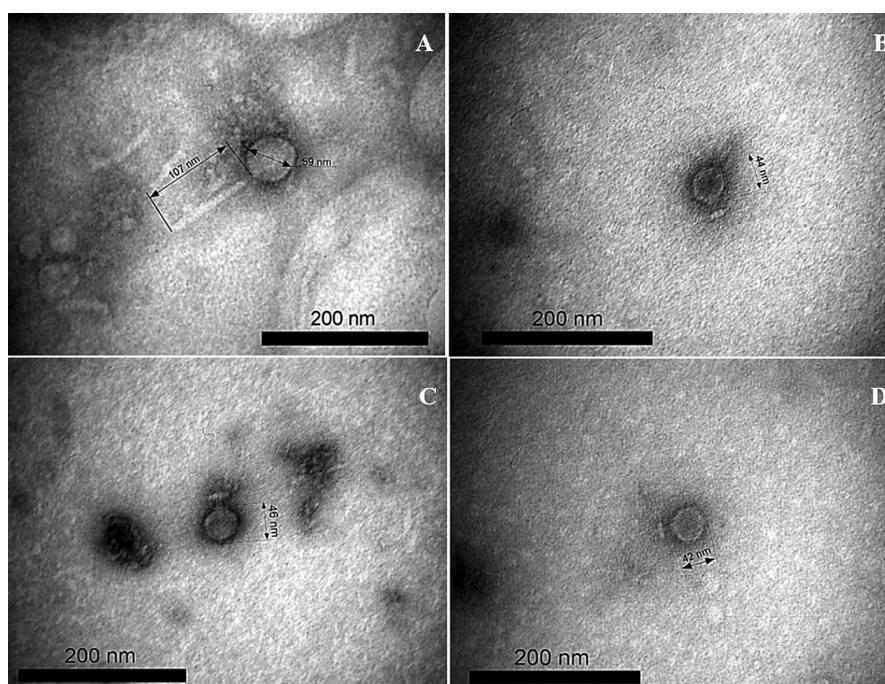
Результаты и обсуждение

Проведено выделение новых бактериофагов, активных в отношении *A. oris* и *Ag. actinomycetemcomitans*, из образцов слюны, зубного налета и содержимого пародонтальных карманов (рис. 1). Использование данных образцов биоматериала для выделения фагов в настоящей работе обусловлено тем, что они могут являться средой обитания микроорганизмов *A. oris* и *Ag. actinomycetemcomitans*. Анализ литературных источников показал, что явление лизогении широко распространено среди штаммов *Ag. actinomycetemcomitans*, а выделенные бактериофаги в основном представляют собой умеренные миовирусы, полученные после различных индуцирующих воздействий на бактерию [6, 16, 28, 29]. В настоящем

исследовании новый бактериофаг, специфичный к *Ag. actinomycetemcomitans*, был выделен из объектов внешней среды без индуцирующего воздействия.

Согласно данным трансмиссионной электронной микроскопии, изоляты фагов vB_AorP_1/G-12 (рис. 1B), vB_AorP_2/Ch-28 (рис. 1C), vB_AorP_3/Bl-35 (рис. 1D) имели икосаэдрический капсид и короткий несокращающийся хвостовой отросток. Бактериофаг vB_AacS_1/Dc-1 (рис. 1A) имел изометрическую головку и длинный несокращающийся хвостовой отросток. В соответствии с классификацией Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)⁴ фаги бактерий *A. oris* были отнесены к подовирусам, а бактериофаг vB_AacS_1/Dc-1 – к сифовирусам. Оценка морфологии негативных колоний показала, что фаги vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, vB_AorP_3/Bl-35 и vB_AacS_1/Dc-1 образуют полностью прозрачные бляшки округлой формы без ореола. Морфологические особенности вирионов фагов и морфология бляшек бактериофагов представлены в таблице 1.

Для получения чистых линий бактериофагов с высокими титрами важно определить следующие параметры: оптимальное значение MOI,



Фотография выполнена авторами / The photograph is taken by the authors

Рис. 1. Электронные микрофотографии фаговых частиц: А – vB_AacS_1/Dc-1; В – vB_AorP_1/G-12; С – vB_AorP_2/Ch-28; D – vB_AorP_3/Bl-35. Контрастирование 2% раствором уранилацетата, увеличение ×250 000.

Fig. 1. Electron micrographs of bacteriophages: vB_AacS_1/Dc-1 (A), vB_AorP_1/G-12 (B), vB_AorP_2 /Ch-28 (C), and vB_AorP_3/Bl-35 (D). Contrasting with 2% uranyl acetate solution, ×250 000.

⁴ <https://ictv.global/taxonomy>

Таблица 1. Морфологические особенности вирионов и морфология бляшек бактериофагов, активных в отношении *Actinomyces oris* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
Table 1. Morphological characteristics of virions and plaques of bacteriophages active against *Actinomyces oris* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Морфология <i>Morphology</i>	Бактериофаг <i>Bacteriophage</i>			
	vB_AorP_1/G-12	vB_AorP_2/Ch-28	vB_AorP_3/Bl-35	vB_AacS_1/Dc-1
Морфология капсида <i>Capsid morphology</i>	Икосаэдрический <i>Icosahedral</i>	Икосаэдрический <i>Icosahedral</i>	Икосаэдрический <i>Icosahedral</i>	Изометрический <i>Isometric</i>
Морфология хвостового отростка <i>Tail morphology</i>	Короткий, несокращающийся <i>Short, non-contractile</i>	Короткий, несокращающийся <i>Short, non-contractile</i>	Короткий, несокращающийся <i>Short, non-contractile</i>	Длинный, несокращающийся <i>Long, non-contractile</i>
Средний диаметр головки, нм <i>Average head diameter, nm</i>	44,00±2,82	46,00±2,49	42,00±2,31	59,00±3,37
Длина хвостового отростка, нм <i>Tail length, nm</i>	–	–	–	107,00±3,16
Размер прозрачной бляшки, мм <i>Clear plaque size, mm</i>	0,8±0,1	1,0±0,2	4,0±0,2	1,2±0,2
Ореол бляшки <i>Plaque halo</i>	Отсутствует <i>Absent</i>	Отсутствует <i>Absent</i>	Отсутствует <i>Absent</i>	Отсутствует <i>Absent</i>

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

представляющее собой среднее количество вирусных частиц на одну клетку, которое рассчитывается путем деления общего количества трансдуцирующих единиц на количество выселяемых клеток; время культивирования системы «фаг–клетка»; стабильность фагов при абиотическом стрессе и при длительном хранении.

Проводили исследование MOI для бактериофагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, vB_AorP_3/Bl-35 и vB_AacS_1/Dc-1 в диапазоне от 0,0001 до 10, чтобы определить оптимальные значения для получения максимальных титров каждого бактериофага. Условия для установления оптимальных значений MOI подобраны на основании культуральных свойств бактерий-хозяев. Результаты, представленные на рисунке 2, свидетельствуют о том, что для бактериофагов vB_AorP_1/G-12 и vB_AorP_2/Ch-28 оптимальное значение MOI равно 1, а самые высокие значения титра фагов получены в условиях анаэробной станции при 37 °C и составили $(4,1 \pm 0,6) \times 10^9$ и $(1,2 \pm 0,3) \times 10^9$ БОЕ/мл соответственно. Фаг vB_AorP_3/Bl-35 показал высокие значения титра и в условиях термостата, и анаэробной станции при MOI 10, однако наивысший титр достигнут в условиях анаэробной станции и составил $(2,0 \pm 0,4) \times 10^9$ БОЕ/мл. Для бактериофага vB_AacS_1/Dc-1 оптимальное значение MOI в условиях CO₂ инкубатора было 0,1, титр составил $(4,5 \pm 0,5) \times 10^9$ БОЕ/мл (рис. 3). Эти значения MOI и условия культивирования использовали для дальнейших экспериментов, а также в технологии производства чистых линий бактериофагов.

Было установлено, что оптимальное время культивирования при температуре 37 °C для фагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 и vB_AorP_3/Bl-35 составило 8–12 ч (рис. 4А–С). За это время происходил лизис тест-культуры (просветление среды по сравнению с контролем), значения титра фагов при этом были равны $(3,4 \pm 1,1) \times 10^9$, $(2,2 \pm 0,5) \times 10^9$, $(1,8 \pm 0,6) \times 10^9$ БОЕ/мл соответственно. Для фага vB_AacS_1/Dc-1 оптимальное время культивирования при температуре 37 °C составило 10–12 ч, титр был равен $(3,1 \pm 0,7) \times 10^9$ БОЕ/мл (рис. 4D). Полученные результаты зависимости значений титра фагов от времени культивирования были оптимальны для работы и использованы в дальнейших исследованиях, а также в технологии производства чистых линий бактериофагов.

При исследовании литического спектра фагов обнаружено, что из 15 исследуемых штаммов *A. oris* бактериофаги vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, vB_AorP_3/Bl-35 лизировали 10, 8 и 12 бактериальных штаммов соответственно. Изолят фага vB_AacS_1/Dc-1 проявлял литическую активность в отношении обоих тестируемых штаммов *Ag. actinomycetemcomitans*. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Результаты исследования специфичности трех выделенных изолятов бактериофагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 и vB_AorP_3/Bl-35 свидетельствуют о том, что фаги проявляют свою активность и в отношении бактерии *A. naeslundii*, играющей важную роль в инициации и прогрессировании образования зубного налета (табл. 3) [30, 31].

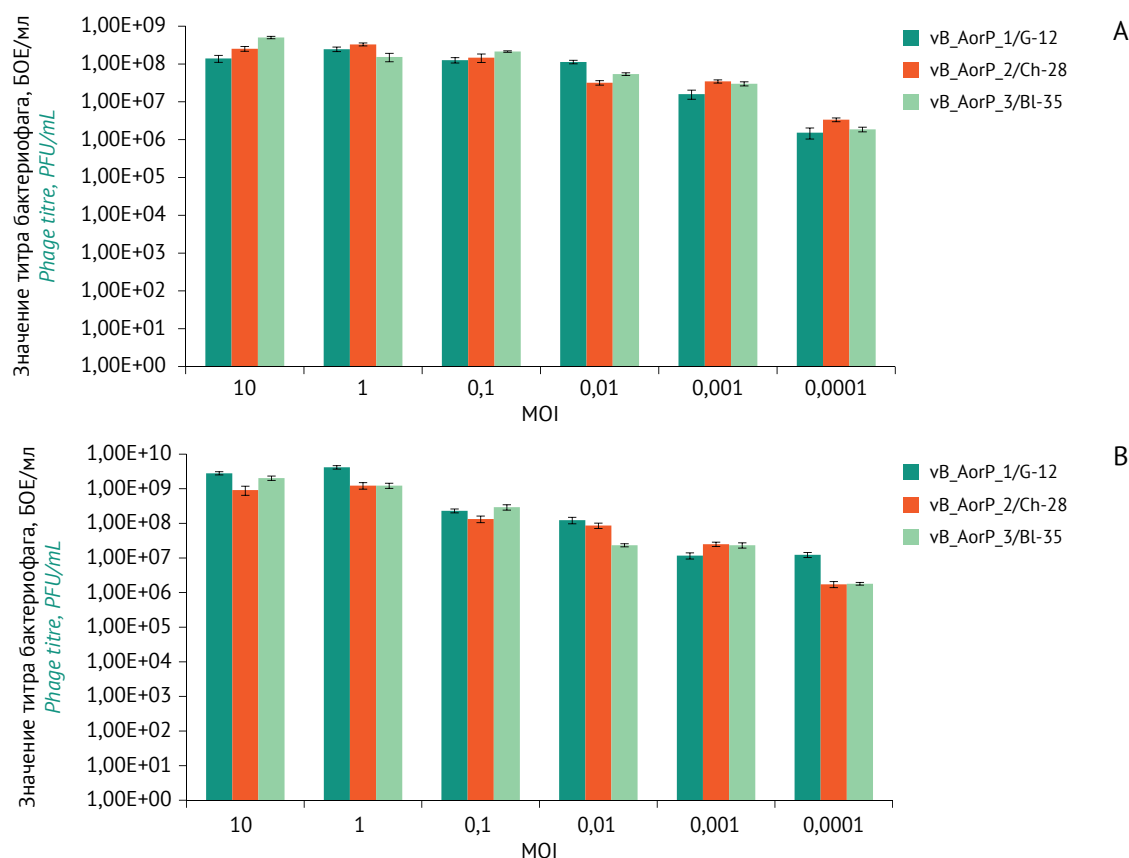


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Результаты определения значения множественности инфекции для бактериофагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 и vB_AorP_3/BI-35 после 8 ч инкубации в условиях термостата (А) и анаэробной станции (В) при 37 °С. Ось X – значения множественности инфекции (MOI). Ось Y – значения титра бактериофагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 и vB_AorP_3/BI-35 в экспоненциальном виде, БОЕ/мл. Результаты основаны на трех повторностях экспериментов. Вертикальные маркеры погрешностей указывают отклонение от среднего значения.

Fig. 2. Results of determining the multiplicity of infection for vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, and vB_AorP_3/BI-35 after 8 hours of incubation in a thermostat (A) and an anaerobic station (B) at 37 °C. X-axis: multiplicity of infection (MOI). Y-axis: titres of vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, and vB_AorP_3/BI-35 in exponential form, PFU/mL. Results are based on triplicate experiments. Vertical error bars indicate the deviation from the mean.

Четыре исследуемых фага продемонстрировали хороший потенциал сохранения литической активности в условиях абиотического стресса. Изоляты фагов vB_AorP_1/G-12 и vB_AacS_1/Dc-1 показали самую высокую термостойкость (60 мин при 80 °С) по сравнению с другими фагами (vB_AorP_2/Ch-28 и vB_AorP_3/BI-35),

которые были полностью инактивированы через 60 мин при 80 °С (рис. 5).

При анализе устойчивости бактериофагов к различным значениям pH (табл. 4) среды было установлено, что при значении pH 2,0 выявлено инактивирующее воздействие на все фаги, активные в отношении *A. oris*. Изоляты фагов

Таблица 2. Исследование чувствительности тест-штаммов *Actinomyces oris* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* к бактериофагам *in vitro*

Table 2. *In vitro* study of *Actinomyces oris* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* test strain sensitivity to bacteriophages

Бактериофаг <i>Bacteriophage</i>	Тест-штамм <i>Test culture</i>	Число исследованных штаммов, N <i>Number of tested strains, N</i>	Число чувствительных штаммов, n (%) <i>Number of sensitive strains, n (%)</i>
vB_AorP_1/G-12	<i>A. oris</i>	15	10 (66,7%)
vB_AorP_2/Ch-28	<i>A. oris</i>	15	8 (53,3%)
vB_AorP_3/BI-35	<i>A. oris</i>	15	12 (80%)
vB_AacS_1/Dc-1	<i>Ag. actinomycetemcomitans</i>	2	2 (100%)

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

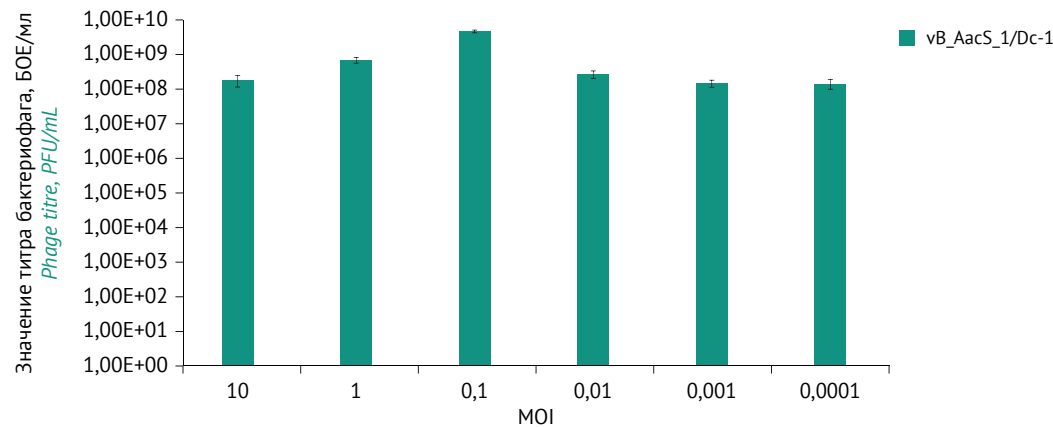


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Результаты определения значения множественности инфекции для бактериофага vB_AacS_1/Dc-1 после 10 ч инкубации в условиях CO₂ инкубатора при 37 °С. Ось X – значения множественности инфекции (MOI). Ось Y – значения титра бактериофага vB_AacS_1/Dc-1 в экспоненциальном виде, БОЕ/мл. Результаты основаны на трех повторностях экспериментов. Вертикальные маркеры погрешностей указывают отклонение от среднего значения.

Fig. 3. Results of determining the multiplicity of infection for vB_AacS_1/Dc-1 after 10 hours of incubation in a CO₂ incubator at 37 °C. X-axis: multiplicity of infection (MOI). Y-axis: titre of vB_AacS_1/Dc-1 in exponential form, PFU/mL. Results are based on triplicate experiments. Vertical error bars indicate the deviation from the mean.

Таблица 3. Исследование специфичности бактериофагов, активных в отношении *Actinomyces oris*, на культурах родственных видов *in vitro*

Table 3. *In vitro* study of the specificity of bacteriophages active against *Actinomyces oris* in cultures of related species

Бактериофаг <i>Bacteriophage</i>	Тест-штамм <i>Test culture</i>	Число исследованных штаммов, N <i>Number of tested strains, N</i>	Число чувствительных штаммов, n (%) <i>Number of sensitive strains, n (%)</i>
vB_AorP_1/G-12	<i>A. naeslundii</i>	9	9 (100%)
	<i>A. odontolyticus</i>	22	0 (0%)
	<i>A. neuii</i>	2	0 (0%)
	<i>A. graevenitzii</i>	3	0 (0%)
	<i>A. canis</i>	1	0 (0%)
	<i>A. georgiae</i>	1	0 (0%)
	<i>A. israelii</i>	1	0 (0%)
	<i>A. meyeri</i>	1	0 (0%)
	<i>A. weissii</i>	1	0 (0%)
vB_AorP_2/Ch-28	<i>A. naeslundii</i>	9	6 (66,7%)
	<i>A. odontolyticus</i>	22	0 (0%)
	<i>A. neuii</i>	2	0 (0%)
	<i>A. graevenitzii</i>	3	0 (0%)
	<i>A. canis</i>	1	0 (0%)
	<i>A. georgiae</i>	1	0 (0%)
	<i>A. israelii</i>	1	0 (0%)
	<i>A. meyeri</i>	1	0 (0%)
	<i>A. weissii</i>	1	0 (0%)
vB_AorP_3/BI-35	<i>A. naeslundii</i>	9	5 (55,6%)
	<i>A. odontolyticus</i>	22	0 (0%)

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

Бактериофаг <i>Bacteriophage</i>	Тест-штамм <i>Test culture</i>	Число исследованных штаммов, N <i>Number of tested strains, N</i>	Число чувствительных штаммов, n (%) <i>Number of sensitive strains, n (%)</i>
vB_AorP_3/BI-35	<i>A. neuui</i>	2	0 (0%)
	<i>A. graevenitzi</i>	3	0 (0%)
	<i>A. canis</i>	1	0 (0%)
	<i>A. georgiae</i>	1	0 (0%)
	<i>A. israelii</i>	1	0 (0%)
	<i>A. meyeri</i>	1	0 (0%)
	<i>A. weissii</i>	1	0 (0%)

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

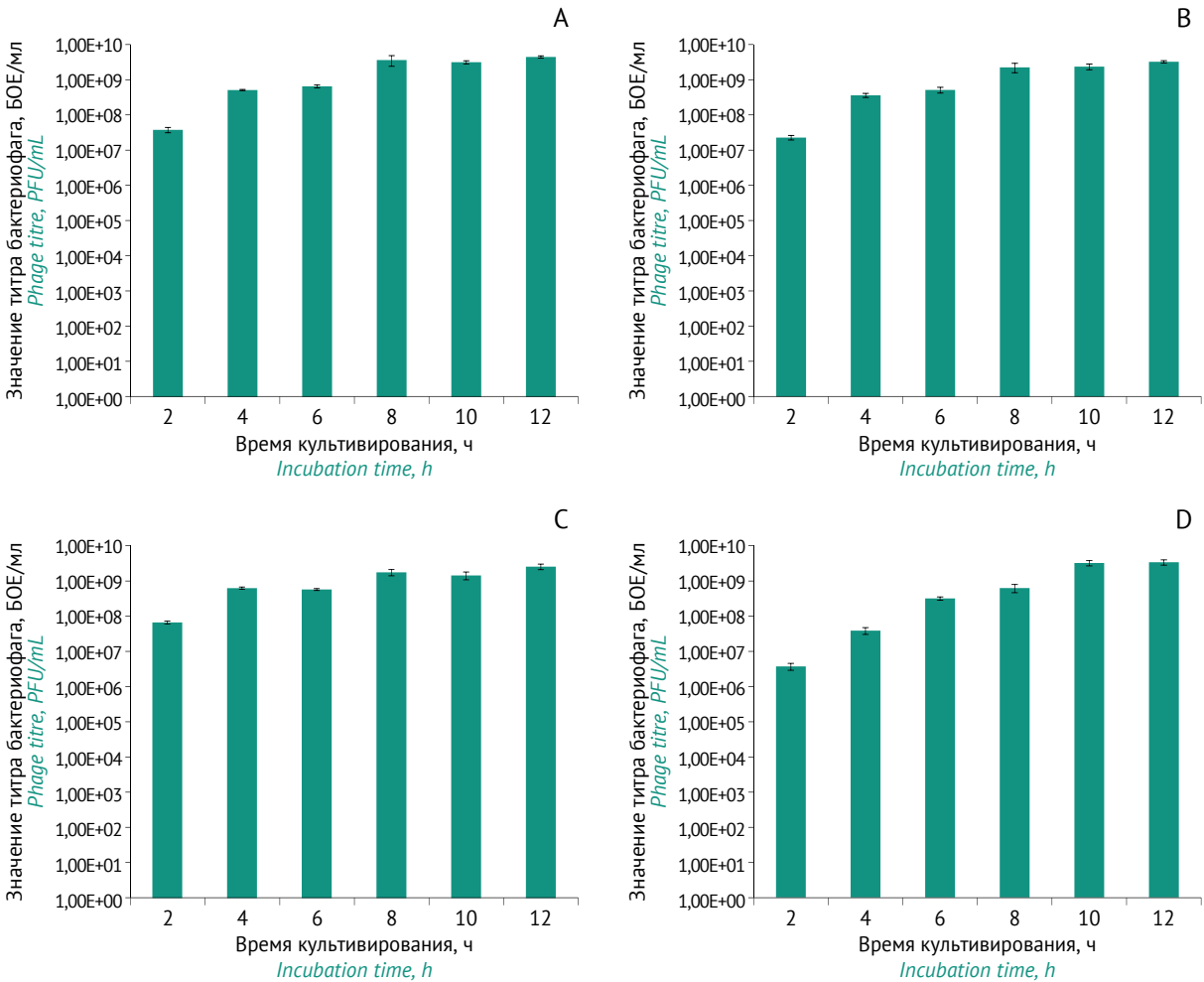


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Соотношение между временем культивирования и активностью фагов при значении множественности инфекции (MOI), равном 1 (А – vB_AorP_1/G-12, В – vB_AorP_2/Ch-28), при значении MOI 10 (С – vB_AorP_3/BI-35) и при значении MOI 0,1 (D – vB_AacS_1/Dc-1). Результаты основаны на трех повторностях экспериментов. Вертикальные маркеры погрешностей указывают отклонение от среднего значения.

Fig. 4. Phage activity as a function of incubation time at a multiplicity of infection of 1 (vB_AorP_1/G-12 (A) and vB_AorP_2/Ch-28 (B)), 10 (vB_AorP_3/BI-35 (C)), and 0.1 (vB_AacS_1/Dc-1 (D)). Results are based on triplicate experiments. Vertical error bars indicate the deviation from the mean.

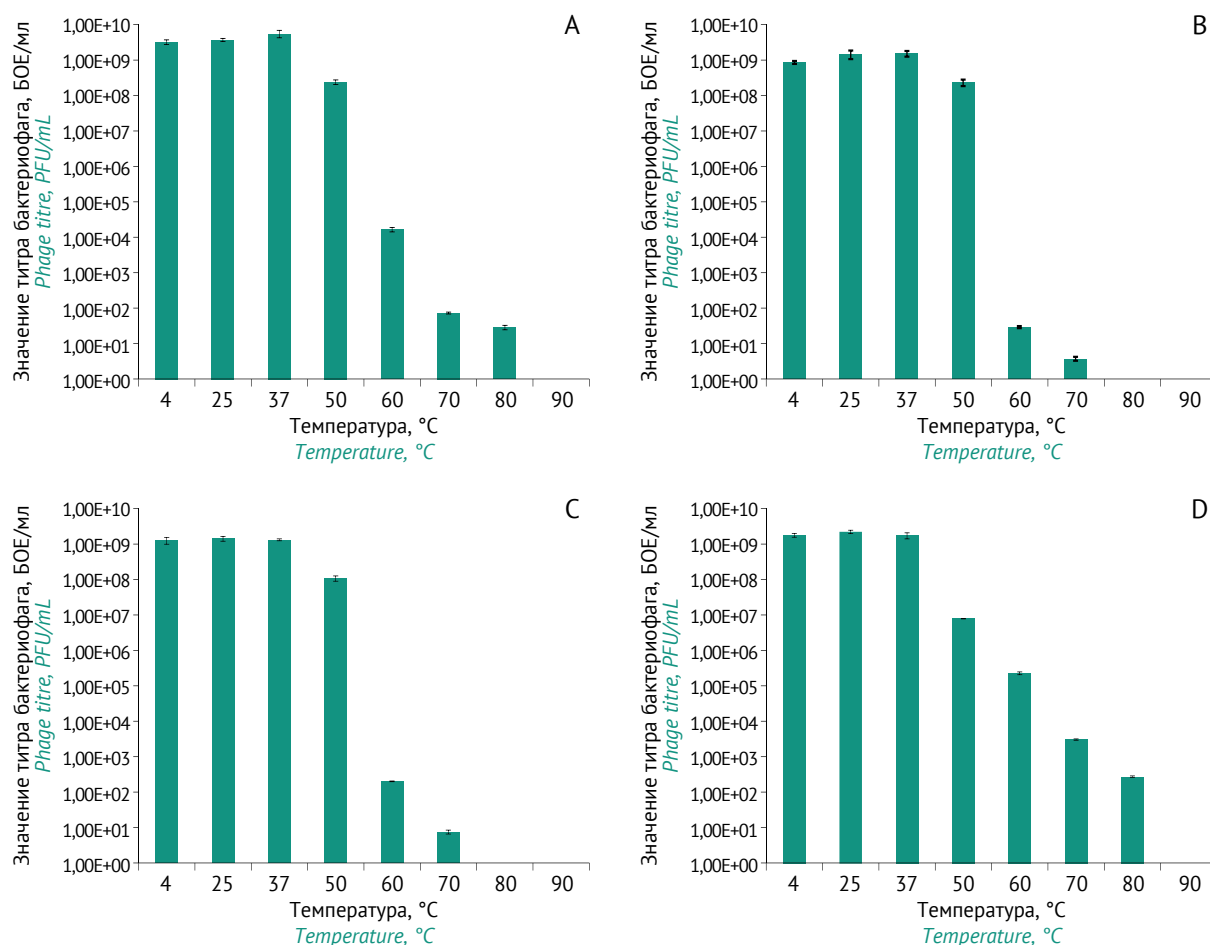


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Устойчивость к тепловому воздействию бактериофагов: А – vB_AorP_1/G-12, В – vB_AorP_2/Ch-28, С – vB_AorP_3/BI-35, D – vB_AacS_1/Dc-1. Результаты основаны на трех повторностях экспериментов. Вертикальные маркеры погрешностей указывают отклонение от среднего значения.

Fig. 5. Thermal resistance of bacteriophages: vB_AorP_1/G-12 (A), vB_AorP_2/Ch-28 (B), vB_AorP_3/BI-35 (C), and vB_AacS_1/Dc-1 (D). Results are based on triplicate experiments. Vertical error bars indicate the deviation from the mean.

vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 при значении pH 11,0 были полностью инактивированы, в то время как изолят фага vB_AorP_3/BI-35 при этом же значении pH сохранял свою активность ((1,2±0,1)×10¹ БОЕ/мл). Бактериофаг

vB_AacS_1/Dc-1 сохранял активность при всех изучаемых значениях pH.

Активность фаговых лизатов, хранившихся при температуре 4 °C, исследовали по истечении 6 мес. Результаты показали, что значения

Таблица 4. Исследование стабильности выделенных изолятов бактериофагов при различных значениях pH

Table 4. Stability study of the isolated bacteriophages at different pH values

pH	Значение титра бактериофага, БОЕ/мл Phage titre, PFU/mL			
	vB_AorP_1/G-12	vB_AorP_2/Ch-28	vB_AorP_3/BI-35	vB_AacS_1/Dc-1
2	0	0	0	(1,0±0,1)×10 ¹
4	(1,0±0,05)×10 ⁵	(5,0±0,5)×10 ⁵	(3,0±0,3)×10 ¹	(2,0±0,8)×10 ⁴
7	(2,8±0,6)×10 ⁹	(1,5±1,6)×10 ⁹	(9,2±1,5)×10 ⁸	(2,1±0,7)×10 ⁹
11	0	0	(1,2±0,1)×10 ¹	(1,0±0,3)×10 ¹

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

Таблица 5. Активность бактериофагов после хранения при 4 °C в течение 6 мес.

Table 5. Viability of bacteriophages after storage at 4 °C for 6 months

Бактериофаг <i>Bacteriophage</i>	Значение титра фага до хранения, БОЕ/мл <i>Phage titre before storage, PFU/mL</i>	Значение титра фага после 6 мес. хранения, БОЕ/мл <i>Phage titre in 6 months, PFU/mL</i>
vB_AorP_1/G-12	(3,4±1,1)×10 ⁹	(3,5±0,3)×10 ⁹
vB_AorP_2/Ch-28	(2,2±0,5)×10 ⁹	(1,3±0,5)×10 ⁹
vB_AorP_3/BI-35	(1,8±0,6)×10 ⁹	(1,0±0,8)×10 ⁹
vB_AacS_1/Dc-1	(3,1±0,7)×10 ⁹	(1,2±1,3)×10 ⁹

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

титра не изменяются после хранения в течение 6 мес. при температуре 4 °C (табл. 5).

Закключение

Выделены три новых бактериофага, активных в отношении *A. oris* (vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, vB_AorP_3/BI-35), и один бактериофаг, активный в отношении *Ag. actinomycetemcomitans* (vB_AacS_1/Dc-1). Изучены биологические свойства бактериофагов, такие как морфология вири-

онов фагов и фаговых бляшек, литическая активность, спектр хозяев, множественность инфекции, время культивирования системы «фаг–клетка», специфичность. Исследуемые фаги продемонстрировали стабильность при абиотическом стрессе и длительном хранении. Таким образом, выделенные бактериофаги являются перспективными для дальнейших научных исследований на клинических штаммах, а также для проведения полногеномного секвенирования.

Литература/References

- Periasamy S, Kolenbrander PE. Central role of the early colonizer *Veillonella sp.* in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol.* 2010;192(12):2965–72. <https://doi.org/10.1128/JB.01631-09>
- Wu C, Mishra A, Reardon ME, Huang IH, Counts SC, Das A, Ton-That H. Structural determinants of *Actinomyces* sortase SrtC2 required for membrane localization and assembly of type 2 fimbriae for interbacterial coaggregation and oral biofilm formation. *J Bacteriol.* 2012;194(10):2531–9. <https://doi.org/10.1128/JB.00093-12>
- Sterzenbach T, Helbig R, Hannig C, Hannig M. Bioadhesion in the oral cavity and approaches for biofilm management by surface modifications. *Clin Oral Investig.* 2020;24(12):4237–60. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03646-1>
- Das V, Vinod V, Biswas L, Kumar A, Biswas R. An update on possible alternative therapeutics for future periodontal disease management. *J Appl Microbiol.* 2023;134(1):lxac039. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac039>
- Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2018;76(1):85–96. <https://doi.org/10.1111/prd.12147>
- Szafrański SP, Winkel A, Stiesch M. The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms. *J Biotechnol.* 2017;250:29–44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.002>
- Tagliaferri TL, Jansen M, Horz HP. Fighting pathogenic bacteria on two fronts: phages and antibiotics as combined strategy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:22. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00022>
- Łusiak-Szelachowska M, Weber-Dąbrowska B, Górski A. Bacteriophages and lysins in biofilm control. *Viral Sin.* 2020;35(2):125–33. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00192-3>
- Suzuki I, Shimizu T, Senpuku H. Role of SCFAs for fimbriin-dependent biofilm formation of *Actinomyces oris*. *Microorganisms.* 2018;6(4):114. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040114>
- Mishra A, Wu C, Yang J, Cisar JO, Das A, Ton-That H. The *Actinomyces oris* type 2 fimbrial shaft FimA mediates co-aggregation with oral streptococci, adherence to red blood cells and biofilm development. *Mol Microbiol.* 2010;77(4):841–54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07252.x>
- Sanchez BC, Chang C, Wu C, Tran B, Ton-That H. Electron transport chain is biochemically linked to pilus assembly required for polymicrobial interactions and biofilm formation in the gram-positive actinobacterium *Actinomyces oris*. *mBio.* 2017;8(3):e00399-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00399-17>
- Kachlany SC. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res.* 2010;89(6):561–70. <https://doi.org/10.1177/0022034510363682>
- Danforth DR, Tang-Siegel G, Ruiz T, Mintz KP. A non-fimbrial adhesin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediates biofilm biogenesis. *Infect Immun.* 2018;87(1):e00704-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00704-18>
- Nambu T, Mashimo C, Maruyama H, Taniguchi M, Huang Y, Takigawa H, et al. Complete genome sequence of *Actinomyces oris* strain K20, isolated from an oral apical lesion. *Microbiol Resour Announc.* 2022;11(8):e0054122. <https://doi.org/10.1128/mra.00541-22>

15. Phichaphop C, Apiwattanakul N, Wanitkun S, Boonsathorn S. Bacterial endocarditis caused by *Actinomyces oris*: first reported case and literature review. *J Investig Med High Impact Case Rep*. 2020;8:2324709620910645.
<https://doi.org/10.1177/2324709620910645>
16. Tang-Siegel GG, Chen C, Mintz KP. Increased sensitivity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* to human serum is mediated by induction of a bacteriophage. *Mol Oral Microbiol*. 2023;38(1):58–70.
<https://doi.org/10.1111/omi.12378>
17. Hbib A, Bouziane A, Lyoussi B, Zouhdi M, Benazza D. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: from basic to advanced research. *Adv Exp Med Biol*. 2022;1373:45–67.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-96881-6_3
18. Gholizadeh P, Pormohammad A, Eslami H, Shokouhi B, Fakhrzadeh V, Kafili HS. Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog*. 2017;113:303–11.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.001>
19. Романова НА, Феоктистова НА, Золотухин СН, Васильев ДА, Алешкин АВ. Сравнительная эффективность методов выделения фагов бактерий *Bacillus megaterium*. *Вестник ветеринарии*. 2013;(1):26–7. Romanova NA, Feoktistova NA, Zolotukhin SN, Vasilyev DA, Aleshkin AV. Comparative efficacy of isolation methods for phages of *Bacillus megaterium*. *Vestnik Veterinarii*. 2013;(1):26–7 (In Russ.). EDN: [PLHIWV](https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-3-273-279)
20. Лурия С, Дарнелл Дж. *Общая вирусология*. М.: Мир; 1970. Luria S, Darnell J. *General virology*. Moscow: Mir; 1970 (In Russ.).
21. Kropinski AM, Prangishvili D, Lavigne R. Position paper: the creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of *Bacteria* and *Archaea*. *Environ Microbiol*. 2009;11(11):2775–7.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01970.x>
22. Адамс М. *Бактериофаги*. М.: Медгиз; 1961. Adams M. *Bacteriophages*. Moscow: Medgiz; 1961 (In Russ.).
23. Гольдфарб ДМ. *Бактериофагия*. М.: Медгиз; 1961. Goldfarb DM. *Bacteriophagy*. Moscow: Medgiz; 1961 (In Russ.).
24. Peng SY, Chen LK, Wu WJ, Paramita P, Yang PW, Li YZ, Lai MJ, Chang KC. Isolation and characterization of a new phage infecting *Elizabethkingia anophelis* and evaluation of its therapeutic efficacy in vitro and in vivo. *Front Microbiol*. 2020;11:728.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00728>
25. Сульдина ЕВ. Разработка ускоренной схемы идентификации листерий с помощью фагового биопрепарата Л.м 4УЛГАУ. *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. 2020;(4):191–7. Sul'dina EV. Development of quick scheme identification of *Listeria* using phage biopreparation L.m 4УЛГАУ. *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. 2020;4(52):191–7 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18286/1816-4501-2020-4-191-197>
26. Орловская ПИ, Гирилович НИ, Пилипчук ТА, Мандрик-Литвинкович МН, Коломиец ЭИ. Влияние физико-химических факторов на выживаемость бактериофагов фитопатогенных бактерий. В кн.: Коломиец ЭИ, ред. *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты*. Минск: Беларуская навука; 2021. С. 204–11. Orlovskaya PI, Girilovich NI, Pilipchuk TA, Mandrik-Litvinkovich MN, Kolomiets EI. Effect of physico-chemical factors on survival of bacteriophages of phytopathogenic bacteria. In: Kolomiets, ed. *Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects*. Minsk: Belaruskaya navuka; 2021. P. 204–11 (In Russ.).
<https://doi.org/10.47612/2226-3136-2021-13-204-211>
27. Кочетова ТА, Юскевич ВВ, Садикова ГТ, Попова ВМ. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов, специфичных к *Bordetella bronchiseptica*. *Ветеринария сегодня*. 2022;11(3):273–9. Kochetova TA, Yuskevich VV, Sadykova GT, Popova VM. Isolation and study of biological properties of *Bordetella bronchiseptica*-specific bacteriophages. *Veterinary Science Today*. 2022;11(3):273–9 (In Russ.).
<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-3-273-279>
28. Stevens RH, Preus HR, Dokko B, Russell DT, Furgang D, Schreiner HC, et al. Prevalence and distribution of bacteriophage phi Aa DNA in strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;119(3):329–37.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06909.x>
29. Loftus A, Delisle AL. Inducible bacteriophages of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Curr Microbiol*. 1995;30(5):317–21.
<https://doi.org/10.1007/BF00295508>
30. Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology (Reading)*. 2009;155(Pt 7):2116–26.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.027706-0>
31. Arai T, Ochiai K, Senpuku H. *Actinomyces naeslundii* GroEL-dependent initial attachment and biofilm formation in a flow cell system. *J Microbiol Methods*. 2015;109:160–6.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.021>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Т.А. Кочетова** — сбор и анализ литературных данных, планирование экспериментов, выполнение экспериментальных работ (исследование специфичности и стабильности выделенных фагов, подбор оптимальных параметров культивирования системы «фаг–клетка») и статистическая обработка данных, обсуждение результатов исследования, написание текста рукописи; **В.В. Юскевич** — обобщение и обсуждение результатов исследования; **Ф.М. Зурабов** — критический анализ результатов исследования; **Г.Т. Садикова** — выполнение экспериментальных работ (исследование литической активности, спектра хозяев, морфологии фаговых бляшек); **П.В. Медведев** — электронно-микроскопические исследования бактериофагов; **В.М. Попова** — обсуждение результатов исследования, 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. **T.A. Kochetova** collected and analysed literature data, planned and conducted the experiments (studied the specificity and stability of isolated phages and selected optimal parameters for cultivating the phage–cell system), carried out statistical data processing, discussed the study results, and drafted the manuscript. **V.V. Yuskevich** generalised and discussed the study results. **F.M. Zurabov** critically analysed the study results. **G.T. Sadykova** performed the experiments (studied the lytic activity, the host spectrum, and the morphology of phage plaques). **P.V. Medvedev** performed electron microscopy of bacteriophages. **V.M. Popova** discussed the study results and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Кочетова Татьяна Андреевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8280-4341>

kochetova@micromir.bio

Юскевич Виктория Викторовна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0459-7479>

v.yuskevich@micromir.bio

Зурабов Федор Михайлович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7947-1128>

fmzurabov@micromir.bio

Садикова Гульнур Тахавиевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7711-7958>

gulnurs.5959@gmail.com

Медведев Павел Витальевич

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8857-9519>

p.medvedev@micromir.bio

Попова Валентина Михайловна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9630-1945>

popovavm9@yandex.ru

Tatiana A. Kochetova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8280-4341>

kochetova@micromir.bio

Victoria V. Yuskevich, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0459-7479>

v.yuskevich@micromir.bio

Fedor M. Zurabov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7947-1128>

fmzurabov@micromir.bio

Gulnur T. Sadykova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7711-7958>

gulnurs.5959@gmail.com

Pavel V. Medvedev

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8857-9519>

p.medvedev@micromir.bio

Valentina M. Popova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9630-1945>

popovavm9@yandex.ru

Поступила 19.09.2023

После доработки 28.02.2024

Принята к публикации 29.02.2024

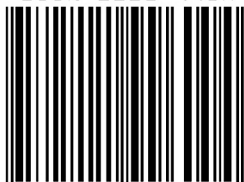
Received 19 September 2023

Revised 28 February 2024

Accepted 29 February 2024



ISSN 2221-996X



9 772221 996004