

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

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Том / Volume	№ / No.
24	4
2024	

ТЕМА, НОМЕРА

Инновационные иммунобиологические препараты



www.biopreparations.ru



Уважаемые коллеги!

Согласно Распоряжению Правительства Российской Федерации от 18.09.2020 № 2390-р основным направлением реализации мероприятий по совершенствованию национального календаря профилактических прививок является включение в него вакцин для профилактики ротавирусной инфекции, ветряной оспы, папилломавирусной и менингококковой инфекций. Главным условием является производство готовых лекарственных форм таких вакцин на территории Российской Федерации и обеспечение поэтапного перехода к полному циклу их выпуска отечественными производителями в необходимых для вакцинации объемах. Кроме того, одной из поставленных задач в связи с неблагоприятной эпидемической ситуацией по заболеваемости коклюшем в Российской Федерации является проведение ревакцинации от данной инфекции детей в возрасте 6–7 лет, 14 лет и лиц старше 18 лет.

По мнению ведущих российских ученых в сфере вакцинопрофилактики, остаются нерешенные проблемы в области как научного, так и производственного этапов. Несмотря на то что российскими учеными и предприятиями/фирмами ведутся разработка, доклинические и клинические исследования новых вакцин, существуют и проблемы, которые до настоящего времени не могут быть решены и требуют комплексного подхода. Ранее заявленная стратегия по отказу от оральной полиомиелитной вакцины в пользу инактивированных вакцин не представляется возможной ввиду ухудшающейся эпидемиологической ситуации в мире и риска международного распространения полиомиелита. Необходимо принять во внимание ощутимый сдвиг заболеваемости коклюшем в старших возрастных группах и принять меры по введению дополнительной бустерной дозы в 7–8-летнем возрасте, в том числе с помощью новых вариантов вакцин. Сегодня особенно актуально предотвращение тяжелых ротавирусных диарей у детей раннего возраста, создание иммунной прослойки лиц, невосприимчивых к ветряной оспе, борьба с папилломавирусной инфекцией с помощью вакцин отечественного производства и снижение заболеваемости тяжелыми формами менингококковой инфекции с использованием усовершенствованных конъюгированных вакцин.

Данный выпуск журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» посвящен инновационным иммунобиологическим препаратам, в первую очередь вопросам разработки вакцин и оценке их качества. В номере представлены статьи по изучению современных вакцин против коклюша и ротавирусной инфекции, рассматриваются и обобщаются материалы по их доклиническим и клиническим исследованиям. Уверен, что представленные в выпуске материалы вызовут большой научный интерес среди специалистов в области медицины, биологии и фармакологии.

С уважением,
доктор медицинских наук, профессор

МИРОНОВ Александр Николаевич

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение

ТОМ 24, № 4, 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 0,860.

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. 4, 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 0.860.

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: *Bordetella pertussis* (лицензированное изображение фотобанка ООО «Фотодженика» <https://photogenica.ru/zoom/PHX473575264/>)

Cover image: *Bordetella pertussis* (a licensed image from the Photogenica image bank <https://photogenica.ru/zoom/PHX473575264/>)

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

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия)

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

Ответственный секретарь

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

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

Редакционная коллегия

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

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

Акоста Бас Кармен, PhD, проф., Latinoамериканский институт биотехнологий «Мечников» (Манагуа, Никарагуа)

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

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Москва, Россия)

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

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

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

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

Гасич Елена Леонидовна, д-р биол. наук, доц., ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» (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)

Дмитриев Игорь Павлович, канд. биол. наук, Университет Вашингтона в Сент-Луисе (Сент-Луис, штат Миссури, США)

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

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

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

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

Смит Елена, канд. биол. наук, Центр передовых мРНК-технологий Санофи (Бостон, штат Массачусетс, США)

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

Шустов Александр Вячеславович, канд. биол. наук, Национальный центр биотехнологии (Астана, Казахстан)

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
Миронов Александр Николаевич,
д-р мед. наук, проф

Научные редакторы
Гуасова Надежда Вадимовна,
канд. биол. наук
Ершов Павел Викторович,
канд. биол. наук

Редактор перевода
Балтина Любовь Александровна

Менеджер по развитию
Мжельский Александр Анатольевич

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
16.12.2024

Дата выхода в свет
18.12.2024

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:

Инновационные иммунобиологические препараты

Д.Т. Кубрава, А.Ю. Медкова, А.З. Матуа, И.Г. Конджария,
А.А. Амичба, Х.З. Трапш, Л.В. Гамгия, С.В. Куликов, Л.Н. Синяшина,
З.Я. Миквабия, Г.И. Каратаев

**Безопасность, иммуногенность и защитная активность
препарата живой коклюшной вакцины ГамЖВК
интраназального применения на экспериментальной
модели детенышей обезьян *Papio hamadryas*363**

А.С. Коровкин, Д.В. Горенков, А.А. Солдатов, В.А. Меркулов
**Особенности проведения доклинических и клинических
исследований вакцин для профилактики
ротавирусной инфекции 377**

И.Е. Филатов, М.М. Силаенкова, В.В. Цибезов, М.В. Баландина,
С.Н. Норкина, О.Е. Латышев, О.В. Елисеева, С.А. Черепушкин,
Т.В. Гребенникова
**Определение специфической активности ротавирусной
вакцины на основе вирусоподобных частиц с использованием
иммуноферментного анализа: разработка
и валидация методики.....389**

М.В. Коврижко, Е.П. Колпакова, Д.С. Колпаков,
Т.И. Твердохлебова, Е.С. Курбатов
**Анализ иммуногенной активности композиции инактивированных
штаммов ротавируса вида А при иммунизации мышей403**

Противовирусные препараты

Е.Л. Гасич, Е.Н. Кроткова, А.Д. Коско, К.Ю. Булда, А.Г. Красько,
Е.А. Дорофеева, И.А. Карпов
**Проблема лекарственной устойчивости вируса SARS-CoV-2
к препаратам прямого противовирусного действия415**

Клеточная терапия

Е.В. Галицына, Е.А. Куликова, Ю.А. Павельев, О.С. Кузнецова,
А.С. Сенина, А.Б. Гусев
**Лекарственные препараты клеточной терапии:
современное состояние исследований428**

Контроль качества

Л.А. Гайдерова, Н.А. Алпатова, С.Л. Лысикова, А.М. Гуськов,
О.В. Головинская
**Оценка специфической активности препаратов
эритропоэтина: современное состояние443**

Т.И. Немировская, И.В. Касина, Н.В. Александрова,
С.А. Алексеева
**Анализ современных регуляторных требований
к качеству живых бактериальных вакцин и перспективы
их усовершенствования.....456**

А.А. Воропаев, О.Ц. Цыдыпова, О.В. Фадейкина, Д.С. Давыдов
**Оценка жизнеспособности тест-штамма *Salmonella enterica*
subsp. *enterica* serovar *Abony* NCTC 6017 в ампулах и флаконах
методом ускоренного хранения467**

Благодарности рецензентам476

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

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof., I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (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)

Carmen Acosta Bas, PhD (Health Sci.), Prof., Latin-American Institute of Biotechnology MECHNIKOV (Managua, Nicaragua)

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)

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)

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 Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health (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)

Igor P. Dmitriev, Cand. Sci. (Biol.), Washington University in St. Louis (Saint Louis, Missouri, United States)

Vyacheslav B. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (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 Y. Logunov, Dr. Sci. (Biol.), Academician of 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)

Elena Smith, Cand. Sci. (Biol.), Sanofi's mRNA Center of Excellence (Boston, Massachusetts, United States)

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

Alexandr V. Shustov, Cand. Sci. (Biol.), National Center for Biotechnology (Astana, Kazakhstan)

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

Aleksandr N. Mironov, Dr. Sci. (Med.), Prof.

Science Editors

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

Pavel V. Ershov, Cand. Sci. (Biol.)

Translation Editor

Liubov A. Baltina

Development Manager

Alexander A. Mzhelsky

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

16 December 2024

Date of publication

18 December 2024

Subscription codes

Pressa Rossii catalogue: 57941

Ural-Press agency catalogue: 57941

The journal is registered as a mass
medium 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

Innovative immunobiologicals

D.T. Kubrava, A.Yu. Medkova, A.Z. Matua, I.G. Kondzariya,

A.A. Amichba, Kh.Z. Trapsh, L.V. Gamgiya, S.V. Kulikov,

L.N. Sinyashina, Z.Ya. Mikvabiya, G.I. Karataev

**Safety, immunogenicity, and protective efficacy of the intranasal
live pertussis vaccine GamLPV in an infant monkey model**

(*Papio hamadryas*)363

A.S. Korovkin, D.V. Gorenkov, A.A. Soldatov, V.A. Merkulov

Preclinical and clinical development of preventive rotavirus

vaccines: special considerations..... 377

I.E. Filatov, M.M. Silaenkova, V.V. Tsibezov, M.V. Balandina,

S.N. Norkina, O.E. Latyshev, O.V. Eliseeva, S.A. Cherepushkin,

T.V. Grebennikova

**Enzyme-linked immunosorbent assay to determine the
potency of a rotavirus vaccine based on virus-like particles:**

analytical procedure development and validation..... 389

M.V. Kovrizhko, E.P. Kolpakova, D.S. Kolpakov, T.I. Tverdokhlebova,

E.S. Kurbatov

Immunogenicity analysis of a composition of inactivated

human rotavirus A strains in mice following immunisation..... 403

Antiviral medicinal products

E.L. Gasich, E.N. Krotkova, A.D. Kasko, K.Yu. Bulda, A.G. Krasko,

E.A. Dorofeeva, I.A. Karpov

The problem of SARS-CoV-2 virus resistance

to direct-acting antivirals..... 415

Cell therapy

E.V. Galitsyna, E.A. Kulikova, Yu.A. Pavelyev, O.S. Kuznetsova,

A.S. Senina, A.B. Gusev

Cell-based medicinal products: a review of current research 428

Quality control

L.A. Gaiderova, N.A. Alpatova, S.L. Lysikova, A.M. Guskov,

O.V. Golovinskaya

Potency evaluation of erythropoietin products: current status 443

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

**Analysis of current regulatory requirements for the quality
of live bacterial vaccines and prospects for the improvement
of vaccine quality control methods 456**

A.A. Voropaev, O.T. Cidipova, O.V. Fadeikina, D.S. Davydov

**Viability assessment of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*
serovar Abony NCTC 6017 in ampoules and vials**

by the accelerated shelf-life testing method..... 467

Thank you to all our reviewers 476



Безопасность, иммуногенность и защитная активность препарата живой коклюшной вакцины ГамЖВК интраназального применения на экспериментальной модели детенышей обезьян *Rapio hamadryas*

Д.Т. Кубрава², А.Ю. Медкова^{1,✉}, А.З. Матуа², И.Г. Конджария², А.А. Амичба²,
Х.З. Трапш², Л.В. Гамгия², С.В. Куликов¹, Л.Н. Синяшина¹, З.Я. Миквабия²,
Г.И. Каратаев¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Гамалеи, д. 18, Москва, 123098, Российская Федерация

² Государственное научное учреждение «Институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии», Гора Трапещия, д. 17, Сухум, 384900, Абхазия

✉ Медкова Алина Юрьевна; baburida@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Прогрессивный рост заболеваемости и младенческой смертности от коклюша обусловлен недостаточной эффективностью существующих вакцин как в России, так и в мире. Ранее разработанная в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России живая рекомбинантная коклюшная вакцина интраназального применения ГамЖВК в клинических исследованиях с участием взрослых добровольцев продемонстрировала формирование длительного противобактерийного иммунитета. Для продолжения клинических исследований данной вакцины с участием добровольцев детского возраста, в том числе младенцев, необходимо проведение доклинических исследований ГамЖВК на экспериментальной модели новорожденных детенышей обезьян.

ЦЕЛЬ. Изучение безопасности и иммуногенности вакцины ГамЖВК при интраназальной иммунизации детенышей обезьян *Rapio hamadryas* и ее противобактерийной защитной активности от экспериментальной коклюшной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе использовали 20 обезьян вида павианов гамадрилов: 7 детенышей возрастом 1–1,5 мес., 7 матерей и 6 обезьян контрольной группы. Определяли динамику изменения количества специфических антител класса IgG к коклюшному токсину и филаментозному гемагглютиниру (КТ+ФГА) в сыворотках крови животных методом ИФА и антител к антигенам *Bordetella pertussis* в реакции агглютинации (РА). ДНК *B. pertussis* в аспиратах регистрировали методом ПЦР в реальном времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Интраназальное введение вакцины ГамЖВК детенышам обезьян сопровождается продукцией специфических антител класса IgG (КТ+ФГА), увеличением титра общих противокклюшных антител в РА и не вызывает местных и общих реакций организма, а также изменений в общем и биохимическом анализах крови. Защитная активность исследуемой вакцины против экспериментальной коклюшной инфекции выражается отсутствием клинико-лабораторных признаков коклюша у иммунизированных животных по сравнению с группой контроля.

ВЫВОДЫ. Показана безопасность и иммуногенность живой коклюшной вакцины интраназального применения ГамЖВК у новорожденных детенышей обезьян павианов гамадрилов. ГамЖВК представляется перспективной для ранней вакцинации младенцев, ревакцинации детей и взрослых, формирования коллективного семейного иммунитета против коклюша.

Ключевые слова: коклюш; живая коклюшная вакцина; интраназальное применение; обезьяны; павианы гамадрилы; *Papio hamadryas*; экспериментальная модель; иммуногенность; безопасность; защитная активность

Для цитирования: Кубрава Д.Т., Медкова А.Ю., Матуа А.З., Конджария И.Г., Амичба А.А., Трапш Х.З., Гамгия Л.В., Куликов С.В., Синяшина Л.Н., Миквабия З.Я., Каратаев Г.И. Безопасность, иммуногенность и защитная активность препарата живой коклюшной вакцины ГамЖВК интраназального применения на экспериментальной модели детенышей обезьян *Papio hamadryas*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(4):363–376. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-363-376>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания «Клиническое исследование инновационной живой вакцины интраназального применения для профилактики коклюша у взрослых и доклиническое изучение ее безопасности и иммуногенности на экспериментальной модели младенцев вида павиана гамадрила», № госрегистрации 121031700333-6.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Safety, immunogenicity, and protective efficacy of the intranasal live pertussis vaccine GamLPV in an infant monkey model (*Papio hamadryas*)

Dzhenni T. Kubrava², Alisa Yu. Medkova^{1,✉}, Alice Z. Matua², Irina G. Kondzariya²,
Astanda A. Amichba², Khamida Z. Trapsh², Lana V. Gamgiya², Sergey V. Kulikov¹,
Lyudmila N. Sinyashina¹, Zurab Ya. Mikvabiya², Gennadiy I. Karataev¹

¹ National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 18 Gamaleya St., Moscow 123098, Russian Federation

² Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Academy of Sciences of Abkhazia, 17 Mount Trapezia, Sukhum 384900, Abkhazia

✉ Alisa Yu. Medkova; baburida@yandex.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The current progressive increase in pertussis incidence and infant mortality rates is due to the insufficient effectiveness of existing vaccines, both in Russia and worldwide. Previous clinical trials showed that healthy adult volunteers developed long-term antibacterial immunity after vaccination with GamLPV, an intranasal recombinant live pertussis vaccine developed by the National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N. F. Gamaleya. Further clinical development of GamLPV in paediatric volunteers, including infants, requires preclinical studies in a newborn monkey model.

AIM. This study aimed to evaluate the safety, immunogenicity, and protective efficacy of the GamLPV vaccine in infant hamadryas baboons (*Papio hamadryas*) challenged with pertussis after intranasal vaccination.

MATERIALS AND METHODS. The study used 20 hamadryas baboons, including 7 infants aged 1–1.5 months, 7 mothers of these infants, and 6 control animals. The study examined the time course of changes in serum levels of specific IgG antibodies to pertussis toxin (PT) and filamentous haemagglutinin (FHA) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), monitored changes in serum levels of *Bordetella pertussis* antibodies by agglutination immunoassay, and detected *B. pertussis* DNA in oropharyngeal aspirates by real-time polymerase chain reaction.

RESULTS. Intranasal GamLPV administration to infant baboons induced the production of specific IgG antibodies to PT and FHA (ELISA) and an increase in the total pertussis antibody titre (agglutination immunoassay). GamLPV did not cause any injection site or systemic reactions. There were no changes in complete blood counts and serum biochemistry profiles after vaccination. The protective efficacy of GamLPV against *B. pertussis* was demonstrated in challenge tests, where immunised animals had no clinical signs or laboratory findings indicative of pertussis in contrast to controls.

CONCLUSIONS. The study demonstrated the safety and immunogenicity of the intranasal live pertussis vaccine GamLPV in newborn hamadryas baboons. GamLPV shows promise in the

primary vaccination of infants, the revaccination of children and adults, and the development of herd immunity against pertussis in families.

Keywords: pertussis; live pertussis vaccine; intranasal administration; monkeys; hamadryas baboons; *Papio hamadryas*; experimental model; immunogenicity; safety; protective efficacy

For citation: Kubrava D.T., Medkova A.Yu., Matua A.Z., Kondzariya I.G., Amichba A.A., Trapsh Kh.Z., Gamgiya L.V., Kulikov S.V., Sinyashina L.N., Mikvabiya Z.Ya., Karataev G.I. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of the intranasal live pertussis vaccine GamLPV in an infant monkey model (*Papio hamadryas*). *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):363–376. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-363-376>

Funding. This study was funded under State Assignment 'A clinical trial of an innovative intranasal live vaccine for the prevention of pertussis in adults and a non-clinical study of the safety and immunogenicity of the vaccine in an infant hamadryas baboon model' (R&D Registry No. 121031700333-6).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Коклюш — высококонтагиозное инфекционное респираторное заболевание человека, вызываемое граммотрицательными бактериями *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*). Несмотря на успехи вакцинопрофилактики коклюш продолжает оставаться серьезной проблемой для здравоохранения во всем мире. Заболеванию коклюшем подвержены все возрастные группы населения, а клинически манифестные формы с типичными «классическими» проявлениями нередко тяжело переносят и взрослые люди. Наиболее опасен коклюш для новорожденных и детей первого года жизни, на долю которых приходится основная часть связанных с заболеванием госпитализаций и летальных исходов.

По оценкам ВОЗ, в разные годы в мире регистрируется 20–40 млн случаев коклюша и 300 тыс. летальных исходов, 95% из которых — в развивающихся странах¹. В 2014 г. зарегистрировано 24,1 млн случаев коклюша, из которых 33% пришлось на Африку [1]. За последние 10 лет эпидемические вспышки коклюша наблюдались каждые 3–5 лет, а в период с 2008 по 2015 г. были значительные всплески случаев коклюша в различных странах, включая США, Канаду, Австралию, Великобританию, Нидерланды и Японию [2].

В Российской Федерации в период с 1991 по 2000 г. зарегистрировано 69, с 2001 по 2010 г. — 18 [3], а в 2023 г. — 10 летальных исходов от коклюша. По ориентировочным расчетам, в Российской Федерации экономический ущерб от коклюша за 2017 г. составил 185 млн рублей, а в 2018 г. превысил 600 млн рублей².

Разработка и внедрение в практику здравоохранения цельноклеточных коклюшных вакцин

(ЦКВ) во второй половине XX века снизили заболеваемость до единичных случаев на 100 тыс. населения. Эпидемиологический эффект от вакцинации позволил отнести коклюш к категории управляемых инфекций. В то же время наряду со снижением заболеваемости коклюшем многолетняя массовая иммунизация ЦКВ позволила выявить нежелательные, часто преувеличенные побочные реакции и поствакцинальные осложнения. Последнее обстоятельство привело в ряде стран к отмене вакцинации против коклюша в 90-х гг. XX века и, как следствие, к резкому увеличению заболеваемости, в том числе тяжелыми формами с летальным исходом. В конце 1990-х — начале 2000-х гг. в экономически развитых странах введено массовое использование бесклеточных компонентов коклюшных вакцин (БКВ) в составе АКДС. С началом вакцинации в ряде стран Европы, США и Австралии, где охват детского населения прививками составляет более 95%, стал отмечаться рост заболеваемости коклюшем, приближающийся в отдельные годы к уровню довакцинного периода [2]. При этом уровень диагностики коклюша в этих странах оценивают в 5–10% от реальной заболеваемости.

Поствакцинальный иммунитет, индуцированный современными БКВ, оказался недостаточно напряженным и продолжительным, что привело к росту числа восприимчивых к возбудителю коклюша подростков и взрослых. Рост числа случаев атипичных форм заболевания затрудняет диагностику коклюша. Наличие неконтролируемого источника коклюшной инфекции, особенно в семьях с новорожденными и в детских организованных коллективах, диктует необходимость введения максимально ранней вакцинации

¹ Global health observatory data. WHO; 2020.

² Государственный доклад о состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 г.

младенцев и ревакцинации всех возрастных групп населения. Однако в настоящее время вакцинацию против коклюша БКВ или ЦКВ начинают не ранее двух-трехмесячного возраста, а для ревакцинации рекомендована только БКВ, не способная обеспечить защиту организма от размножения и передачи бактерий [4].

Альтернативой ЦКВ и БКВ может быть разработанный в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России препарат ГамЖВК (живая коклюшная вакцина) для интраназального применения на основе рекомбинантных аттенуированных бактерий возбудителя коклюша [5]. Аналогичная рекомбинантная живая коклюшная вакцина (BPZE1) разработана во Франции [6, 7]. Обе вакцины прошли клинические исследования с участием взрослых добровольцев. Вакцина ГамЖВК готовится к регистрации в качестве препарата для ревакцинации взрослых.

Для продолжения клинических исследований ГамЖВК с участием добровольцев детского возраста, в том числе младенцев, нами проведены исследования на детенышах обезьян вида павиан гамадрил. В предыдущей публикации авторы описали разработку экспериментальной модели коклюшной инфекции на новорожденных детенышах павианов гамадрилов и предварительные результаты изучения безопасности и иммуногенности многократного интраназального введения ГамЖВК новорожденным обезьянам [8].

Цель работы – изучение безопасности и иммуногенности вакцины ГамЖВК при интраназальной иммунизации детенышей обезьян *Papio hamadryas* и ее противобактерийной защитной активности от экспериментальной коклюшной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использовали следующие материалы:

- лиофильно высушенный препарат ГамЖВК (живая коклюшная вакцина интраназального применения для профилактики коклюша), приготовленный на производстве ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, содержащий 5×10^9 живых аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS [5];
- вирулентные бактерии *B. pertussis* 475. Суспензию культуры вирулентных бактерий *B. pertussis* 475 готовили непосредственно перед введением. Бактерии культивировали на среде КУА – казеино-угольный агар (производство филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) с добавлением дефибрированной бараньей крови

(АО «Эколаб»), в течение 24–36 ч, смывали 0,85% раствором натрия хлорида для приготовления суспензии по стандарту оптической плотности, равной 50–100 МОЕ (по фармакопейному стандартному образцу мутности бактериальных взвесей, полученного от ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России). Количество живых бактерий *B. pertussis* 475 оценивали методом для определения КОЕ на среде КУА с кровью при культивировании в течение 3–4 сут. Культура с мутностью 50 МОЕ соответствовала $(1-2) \times 10^{10}$ КОЕ/мл;

- биологический материал со слизистых оболочек верхних дыхательных путей обезьян вида *Papio hamadryas* – назофарингеальные мазки и ротоглоточные аспираты получали от детенышей и их матерей с помощью назофарингеальных зондов и ротоглоточных тампонов;
- цельная кровь и сыворотка крови, полученные от детенышей и их матерей. Забор крови у детенышей осуществляли из паховой вены при помощи шприца, у неполовозрелых животных – иглой-бабочкой для вакуумного забора крови из локтевой вены, у половозрелых особей – двухсторонней иглой для вакуумного забора крови из локтевой вены утром натощак.

Кровь и аспираты от детенышей, их матерей и обезьян контрольной группы отбирали по описанной ранее схеме с использованием наркоза и прижимных клеток [9].

Экспериментальные животные

В эксперимент было включено 20 павианов гамадрилов разного возраста: 7 детенышей в возрасте 1–1,5 мес., 7 молодых половозрелых самок в возрасте 6–10 лет и по 3 особи в каждой контрольной группе (итого 6) в возрасте 2 и 6–10 лет. Детеныши были рождены и содержались в период эксперимента вместе с их матерями в питомнике при ГНУ «ЭПИТ АНА» (Абхазия). Животные контрольной и опытной групп содержались в разных помещениях экспериментального корпуса в индивидуальных клетках из нержавеющей стали, оборудованных кормушкой и сосковой поилкой, держателем для этикетки, при контролируемых условиях окружающей среды (температура 20–25 °С, относительная влажность 60–70%). В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения. Животные имели свободный доступ к воде и корму. Обезьяны находились на типовом рационе, разработанном в ГНУ «ЭПИТ АНА»: брикетированный корм, сбалансированный по содержанию белков, жиров,

углеводов, витаминов, минеральному составу, с добавкой овощей, фруктов и зелени.

Данная исследовательская работа была одобрена приматологической комиссией ГНУ «ИЭПит АНА» от 24.12.2019 и утверждена как Тема НИР 1.8. «Оценка безопасности и иммуногенности рекомбинантной живой коклюшной вакцины на экспериментальной модели детенышей павианов гамадрил» Академией наук Абхазии.

Все обезьяны на начало эксперимента находились в состоянии клинического и соматического здоровья, были серонегативны к антигенам *B. pertussis*. В рото- и носоглотке не было выявлено ДНК *B. pertussis*. Беременные самки находились под наблюдением до и после рождения детенышей. В ходе эксперимента ни одна обезьяна не пострадала.

Методы

Иммунизация и экспериментальная инфекция детенышей и взрослых животных

Манипуляции с детенышами обезьян и их матерями проводили в соответствии с ранее разработанными и описанными нами условиями [8]. Перед началом эксперимента осуществляли загон матери с детенышем в прижимную клетку. Мать усыпляли, а детеныша переносили в манипуляционную комнату для осуществления всех требуемых процедур. Перенос детеныша и все манипуляции контролировались ветеринарным врачом. Манипуляции со спящей матерью (взятие мазков, крови, осмотр врачом) проводили в отдельной комнате. Детеныш возвращался к матери до ее пробуждения. Матери с детенышами, участвующие в эксперименте, находились в общем помещении (загоне), отдельно от остальных членов семей на протяжении всего времени наблюдения.

За состоянием здоровья экспериментальных обезьян наблюдали при ветеринарном осмотре, включающем термометрию, взвешивание, осмотр слизистых оболочек, оценку состояния ротоглотки и наблюдение за поведением животных. Экспериментальную работу с животными проводили в соответствии с ГОСТ 33218-2014³ и правилами работы с лабораторными животными [10].

Обследование обезьян-матерей и их детенышей включало:

- клинический и биохимический анализ крови, анализ сыворотки крови на наличие антител к бактериям *B. pertussis*, физикальный осмотр ротоглотки и взвешивание;

- взятие мазков из зева и носоглотки для ПЦР анализа;
- взвешивание детенышей, их осмотр ветеринарным врачом, определение общего соматического здоровья, состояния ротоглотки, поведения и реакций на внешние факторы.

За поведением матерей и их детенышей наблюдали на протяжении всего срока эксперимента.

Иммунизацию, взятие крови и назофарингеальных мазков у детенышей проводили без наркоза. Обезьян-матерей и обезьян контрольной группы усыпляли внутримышечным введением 0,03–0,04 мл золетила (Virbac, Франция) в концентрации 100 мг/мл (с премедикацией ксилазингидрохлоридом 20 мг/мл).

Интраназальное введение животным препарата ГамЖВК и вирулентных бактерий *B. pertussis*. Непосредственно перед введением во флакон с препаратом ГамЖВК добавляли 0,6 или 1,0 мл стерильного 0,85% раствора натрия хлорида в зависимости от возраста животных. Лиофилизат растворяли в течение 1 мин, слегка встряхивая флакон, после чего вводили суспензию интраназально по 0,3–0,5 мл в каждую ноздрю через шприц объемом 2 мл (без иглы).

Суспензию вирулентных бактерий *B. pertussis*, содержащую $(2-5) \times 10^{10}$ КОЕ, вводили по 0,5 мл в каждую ноздрю под наркозом.

Анализ сыворотки крови на присутствие специфических иммуноглобулинов проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) в модификации [8]. В реакции прямой агглютинации использовали набор «Диагностикум коклюшный жидкий» (Биомед, Россия).

ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) применяли для количественного определения ДНК *B. pertussis* в аспиратах и назофарингеальных мазках. Для молекулярно-генетического анализа использовали ДНК *B. pertussis*, выделенную из смывов с заднеглоточных и назофарингеальных зондов. Осадки из этих препаратов после центрифугирования обрабатывали раствором гуанидинтиоцианата с последующей сорбцией ДНК на магнитном сорбенте «Wizard® Magnetic DNA Purification System» (Promega, США) [11, 12]. Для определения количества геном-эквивалентов (ГЭ) ДНК *B. pertussis* в образцах использовали разработанную и валидированную нами тест-систему на основе ПЦР РВ [11, 12]. Амплификатор нуклеиновых кислот CFX96 Touch (Bio-Rad, США) использовали для постановки ПЦР РВ.

³ ГОСТ 33218-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за нечеловекообразными приматами.

Общий анализ крови (ОАК) выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе Mindray BC-3600 (Mindray, КНР).

Биохимический анализ образцов сыворотки крови (БАК) выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе Horiba ABX Pentra 200 (Horiba ABX, Франция).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение безопасности интраназального введения препарата ГамЖВК детенышам обезьян

Детенышам возрастом 1–1,5 мес. проводили первичную иммунизацию (V1) и две реиммунизации (V2 и V3) с интервалом в 2 мес. Через 12 мес. после второй реиммунизации детенышей экспериментально инфицировали изогенными вирулентными бактериями возбудителя коклюша *B. pertussis* 475.

Критериями оценки безопасности препарата ГамЖВК и последующего введения вирулентных бактерий *B. pertussis* 475 служило отсутствие достоверных отклонений от средних показателей возрастных норм для данного питомника и значений показателей, определенных до введения препарата, а также состояние здоровья обезьян (отсутствие местных реакций, потеря веса и изменение поведения).

Биоматериал собирали в динамике в следующие сроки: перед иммунизацией, через 1 ч после нее (мазок), далее – через 3, 7, 14, 21, 28, 42 сут и 2 мес. Аналогичные сроки соблюдали после каждой последующей иммунизации. В те же сроки, кроме точки «1 час» после введения препарата, забирали биоматериал и у обезьян-матерей. Дополнительно определяли содержание антител и бактериальную нагрузку в мазках со слизистой оболочки носоглотки через 6 мес. после третьей реиммунизации и непосредственно перед введением вирулентных бактерий.

Основной акцент в ОАК и БАК был сделан на анализе лейкоцитарного ростка, в частности, определяли соотношение лимфоцитов и нейтрофилов, СОЭ, глюкозы, а также активности аланиновой (АЛТ) и аспарагиновой (АСТ) аминотрансфераз. В процессе текущего исследования выявлен ряд особенностей работы с детенышами обезьян месячного возраста. К ним можно отнести сложность взятия достаточного количества крови для полного ОАК, БАК, сыворотки крови для ИФА и реакции агглютинации, особенно после первого введения вакцины. Второе важное обстоятельство – физиологический стресс у детенышей обезьян, ранее не подвергавшихся обследованию: стресс способен влиять на значения некоторых показателей крови. Вероятно, в силу этих причин измеренные

значения количества лимфоцитов и глюкозы сильно варьировали от особи к особи. Эти особенности, а также небольшое количество обезьян в эксперименте и отсутствие четких представлений о норме для данного вида и возраста животных (детеныши-груднички) затрудняло оценку статистической значимости выявленных отклонений. По этой причине для анализа динамики изменения параметра использовали значение K_p , равное отношению абсолютных значений в сравниваемой точке и до введения препарата. Изменения параметра K_i считали статистически значимыми при значении $K_i \geq 2$ в контрольных точках.

Значимые различия у иммунизированных детенышей не были выявлены при использовании описанного алгоритма для характеристики динамики изменения параметров ОАК и БАК. Не было зарегистрировано значимых отклонений в содержании лейкоцитов крови и их популяций (лимфоциты и нейтрофилы) или уменьшения содержания глюкозы, так же как и в предыдущих исследованиях на обезьянах [8, 13] и клинических исследованиях [14].

После экспериментальной инфекции вирулентными бактериями неполовозрелых животных контрольной группы, как и в предыдущих экспериментах [8, 9, 13], отмечен достоверный более чем двукратный рост содержания лимфоцитов крови на 14–21 сут. У двух обезьян контрольной группы рост содержания лимфоцитов составил 4,7 и 5,6 раза, а у одной – увеличился в два раза.

Не было зарегистрировано достоверного снижения содержания глюкозы у иммунизированных детенышей после экспериментальной инфекции вирулентными бактериями. Также не было выявлено снижения содержания глюкозы у неполовозрелых обезьян контрольной группы, в отличие от предыдущих экспериментов [8, 9, 13]. Можно предположить, что отсутствие выраженной гипогликемии у животных контрольной группы связано с режимом питания или с упомянутым выше стрессом у молодых животных.

У двух из трех детенышей контрольной группы на 7 сут после инфекции был отмечен примерно 10-кратный рост показателей активности АЛТ от 70 до 850 и от 100 до 863 Ед/мл и АСТ от 79 до 790 и от 35 до 410 Ед/мл в сравнении со значениями показателей до экспериментального заражения вирулентными бактериями. Спустя неделю показатели активности АЛТ и АСТ возвращались к исходным. Остальные биохимические показатели анализа крови оставались стабильными. После иммунизации

обезьян отклонений от фоновых показателей БАК не было зарегистрировано. Следует заметить, что нам неизвестно о каких-либо изменениях активности АЛТ и АСТ у детей или взрослых пациентов с коклюшем. Достоверное увеличение значений АЛТ и АСТ у обезьян и наличие такового у больных коклюшем детей и/или взрослых требует дальнейшего изучения.

После экспериментальной инфекции вирулентными бактериями обезьян-матерей, контактировавших с иммунизированными детенышами, не выявлено каких-либо изменений показателей ОАК и БАК. Тогда как у инфицированных взрослых животных контрольной группы ОАК позволил обнаружить достоверный рост содержания лимфоцитов на 14–28 сут после инфекции – в 2,2, 3,8 и 5,4 раза при стабильных значениях остальных показателей. По данным БАК было некоторое снижение содержания глюкозы после инфицирования взрослых животных контрольной группы вирулентными бактериями (в 2,0, 2,4 и 1,9 раза). Увеличение активности АЛТ и АСТ не было зарегистрировано.

Ветеринарное наблюдение за обезьянами на каждом из визитов, в том числе после экспериментальной инфекции, а также регулярное наблюдение за их поведением не выявило отклонений в состоянии здоровья и развитии детенышей после каждой иммунизации животных. Отсутствовали местные реакции в носоглотке животных после иммунизации и экспериментальной инфекции иммунизированных детенышей. Катаральные явления в виде гиперемии разной интенсивности и слизи в ротоглотке, аналогичные тем, что наблюдались в предыдущих экспериментах, были выявлены у инфицированных половозрелых и неполовозрелых обезьян контрольной группы.

Полученные результаты указывают на отсутствие симптоматики коклюша после иммунизаций, а стабильность параметров ОАК и БАК – на безопасность и хорошую переносимость живой коклюшной вакцины ГамЖВК при интраназальном применении у детенышей павиана гамадрила. Даже трехкратное интраназальное введение ГамЖВК детенышам обезьян в возрасте 1–1,5 мес. не приводило к значимым изменениям лабораторных показателей крови детенышей и их матерей, тогда как у детенышей контрольной группы наблюдался краткосрочный, но выраженный рост активности печеночных ферментов (АЛТ и АСТ) и содержания лимфоцитов. В процессе клинических исследований ГамЖВК на добровольцах и доклинических исследованиях на взрослых обезьянах также не было зарегистрировано достоверного

изменения содержания лимфоцитов, глюкозы и других показателей ОАК и БАК после одно-, двух- и трехкратного интраназального введения аттенуированных бактерий.

Отсутствие местных реакций и достоверных изменений показателей ОАК и БАК после экспериментальной инфекции иммунизированных детенышей и их матерей вирулентными бактериями *B. pertussis* 475 указывает на проявление защитного эффекта иммунизации детенышей обезьян от развития симптомов и последствий коклюшной инфекции.

Характеристики гуморального ответа, индуцированного иммунизацией младенцев павианов гамадрилов и контактировавших с ними матерей

Проведенные ранее исследования позволили выявить значимые изменения уровня специфических IgG и титров агглютинации в образцах сыворотки крови низших обезьян Старого Света, интраназально иммунизированных ГамЖВК или экспериментально инфицированных вирулентными бактериями возбудителя коклюша [8, 9, 13, 15, 16], а также взрослых добровольцев [14, 16]. На *рисунке 1* представлены результаты оценки содержания специфических IgG по значениям ОП образцов в лунках планшет-набора для ИФА в соответствии с предложенной нами модификацией после трех последовательных интраназальных введений ГамЖВК.

Результаты иммунизации были аналогичными ранее описанным для взрослых обезьян и добровольцев [8, 9, 13, 15, 16]. После первой иммунизации регистрировался медленный рост содержания специфических IgG к коклюшному токсину (КТ) и филаментозному гемагглютинину (ФГА). Точки «3 сут» и «7 сут» на графике первой иммунизации не представлены, так как выработка антител класса IgG при первичной иммунизации происходила с 10–14 сут.

Повторные введения вакцины (реиммунизация V2 и V3) детенышам обезьян сопровождалось значительно более ранним началом увеличения содержания антител класса IgG в сыворотке крови. У всех детенышей значимый рост содержания IgG отмечали уже через неделю; максимальный рост был на 2–4 нед. К концу 6 и 12 мес. содержание антител снижалось, но оставалось значительно выше такового до иммунизации.

Изменения содержания IgG в сыворотке крови обезьян-матерей имели схожую динамику, и, в конечном итоге, содержание IgG приближалось к значениям у иммунизированных детенышей (результаты не представлены).

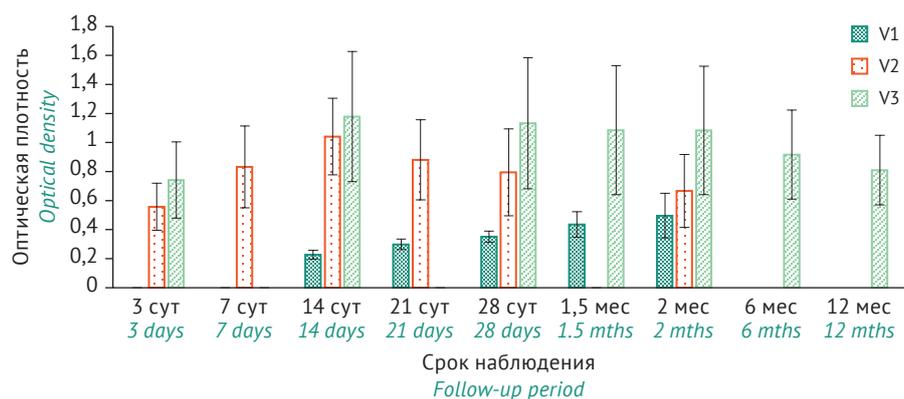


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Оценка содержания IgG по динамике изменения значений оптической плотности в сыворотке крови детенышей после каждой иммунизации по данным ИФА. По оси X – сроки наблюдения за детенышами от даты введения им ГамЖВК. По оси Y – измеренные значения оптической плотности образцов в лунках планшета. V1 – первичная иммунизация, V2 – первая реиммунизация, V3 – вторая реиммунизация детенышей.

Fig. 1. Assessment of serum IgG levels of infant baboons by optical density changes determined by ELISA after each vaccination. The X-axis shows the period of observation, specifying the time since GamLPV administration. The Y-axis shows optical density values for samples in wells. V1, V2, and V3 stand for priming, first booster, and second booster vaccination of infant baboons.

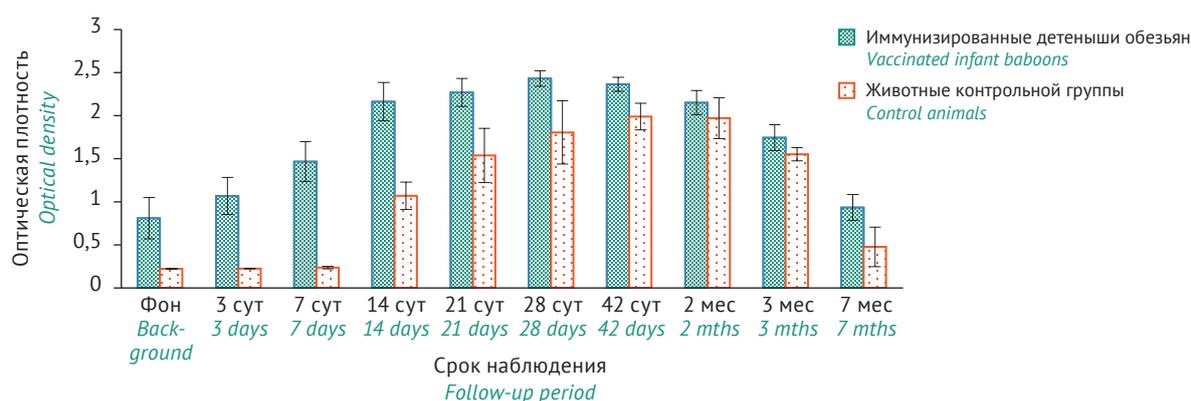


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Оценка содержания IgG по динамике изменения значений оптической плотности в сыворотке крови иммунизированных детенышей после экспериментальной инфекции по данным ИФА. По оси X – сроки наблюдения за детенышами от даты введения им вирулентных бактерий. По оси Y – измеренные значения оптической плотности образцов в лунках планшета.

Fig. 2. Assessment of serum IgG levels of vaccinated infant baboons by optical density changes determined by ELISA after challenge with virulent bacteria. The X-axis shows the period of observation, specifying the time since challenge. The Y-axis shows optical density values for samples in wells.

Через 12 мес. после второй реиммунизации (V3) было проведено экспериментальное инфицирование животных вирулентными изогенами бактериями *B. pertussis* 475 (рис. 2, 3). В контрольной группе инфицировали 3 половозрелые и 3 неполовозрелые особи того же возраста, что и иммунизированные обезьяны к моменту экспериментальной инфекции вирулентными бактериями *B. pertussis* 475.

Содержание IgG после экспериментальной инфекции у иммунизированных детенышей, несмотря на значительное содержание перед инфицированием, начинает

увеличиваться уже на 3 сут после заражения и достигает максимума через 14–28 сут. У животных контрольной группы монотонный рост содержания IgG начинается на 14 сут и продолжается вплоть до 42–60 сут (рис. 2).

Интерес представлял также быстрый и значительный рост содержания антител класса IgG в сыворотке крови обезьян-матерей начиная с 3–7 сут при более медленном монотонном увеличении у животных контрольной группы с 28 сут (рис. 3).

Быстрое увеличение содержания специфических антител в сыворотке крови обезьян-матерей

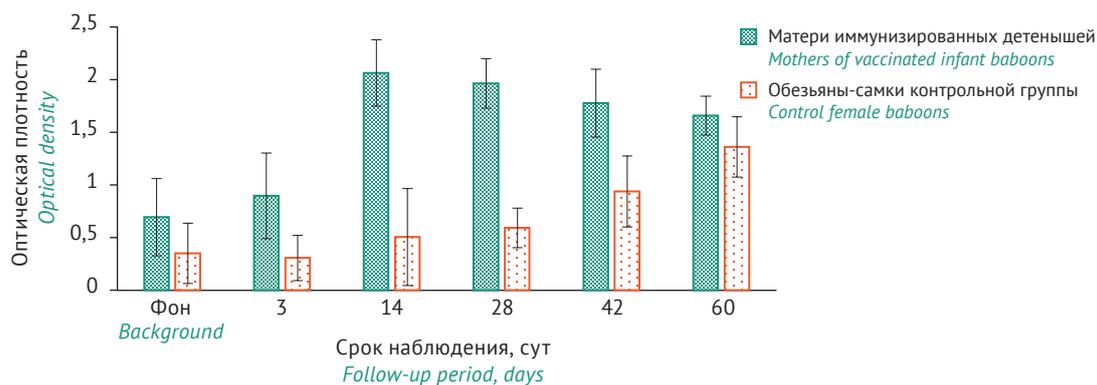


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Оценка содержания IgG по динамике изменения значений оптической плотности в сыворотке крови обезьян-матерей после экспериментальной инфекции по данным ИФА. По оси X – сроки наблюдения за обезьянами от даты введения вирулентных бактерий детенышам. По оси Y – измеренные значения оптической плотности образцов в лунках планшета.

Fig. 3. Assessment of serum IgG levels of baboon mothers by optical density changes determined by ELISA after challenge with virulent bacteria. The X-axis shows the period of observation, specifying the time since challenge. The Y-axis shows optical density values for samples in wells.

после экспериментального инфицирования свидетельствует о пассивной иммунизации обезьян-матерей при тесном контакте с иммунизированными детенышами. Это подтверждается отсутствием нарушений каких-либо лабораторных показателей и клинических признаков коклюшной инфекции у обезьян-матерей после экспериментальной инфекции вирулентными бактериями.

Определение титров агглютинации с суспензией бактерий *B. pertussis* – один из используемых в настоящее время методов регистрации иммунного ответа. Значения титров агглютинации сыворотки крови иммунизированных детенышей и их матерей после экспериментального инфицирования демонстрируют аналогичную динамику с данными ИФА (результаты не представлены). Использование реакции агглютинации (РА) в большинстве случаев не выявило отличий от результатов, полученных с помощью ИФА, что можно было ожидать исходя из более широкого спектра антител к возбудителю коклюша, формирующих агглютинацию бактерий тест-штаммов в РА. Однако недостаточная воспроизводимость результатов РА, полученных с помощью разных серий наборов, указывает на их низкий уровень стандартизации и делает нецелесообразным использование РА при наличии наборов для ИФА.

Динамика размножения аттенуированных бактерий *B. pertussis* в носоглотке после интраназальной иммунизации младенцев павианов гамадрилов и их экспериментальном инфицировании

Напряженность и длительность формирования защитного иммунитета от коклюша после

вакцинации и/или перенесенной инфекции оценивают по наличию гуморального и клеточного противобактерийного ответа. Во втором случае при коклюше оценивают индуцированную продукцию интерферона (IFN) и интерлейкина-17 (IL-17) полиморфноядерными клетками крови [17]. Работа была проведена нами ранее в доклинических экспериментах со взрослыми обезьянами и в рамках клинических исследований на здоровых добровольцах. Однако наиболее адекватное представление о защитном потенциале препарата ГамЖБК, с нашей точки зрения, может дать сравнительный анализ времени элиминации вирулентных и/или аттенуированных бактерий *B. pertussis* у иммунизированных и нативных животных.

Преыдушие исследования гуморального ответа и динамики размножения/выведения бактерий *B. pertussis* из рото/носоглотки обезьян продемонстрировали, во-первых, общность наблюдаемой картины для вирулентных и аттенуированных бактерий, а во-вторых, выраженное сокращение времени выведения бактерий после первого и последующих интраназальных введений взрослым обезьянам [14, 16]. В настоящем разделе представлены результаты определения содержания ДНК бактерий *B. pertussis* в рото/носоглотке иммунизированных детенышей и их матерей на протяжении срока наблюдения, включая периоды после первичной иммунизации (V1), двух последующих реиммунизаций (V2 и V3) и экспериментальной инфекции вирулентными бактериями. В качестве контроля использованы неинфицированные взрослые обезьяны и детеныши.

Назофарингеальные аспираты однократно иммунизированных детенышей содержали ДНК возбудителя коклюша вплоть до повторной иммунизации через 2 мес. (рис. 4). После первой (V2) и второй (V3) реиммунизаций в аспиратах на 14 сут наблюдения ДНК была зарегистрирована только у одного иммунизированного детеныша, а к 28 сут и позднее ДНК не была обнаружена (рис. 5).

Отмечается нерегулярная динамика выявления ДНК аттенуированных бактерий *B. pertussis* у обезьян-матерей. Регистрируется до 10 ГЭ ДНК в аспиратах, взятых у 6 из 7 обезьян-матерей в период от 7 сут до 2 мес. (2 особи) после первого введения препарата младенцам (результаты не приведены). После второй иммунизации детенышей обезьян ДНК бактерий *B. pertussis* обнаружена только у двух обезьян-матерей на 21 сут, в значимо меньшем количестве, чем после первой иммунизации. После третьей иммунизации динамика, хотя и отличалась от динамики после второй иммунизации, в конечном итоге характеризовалась элиминацией бактерий почти у всех обезьян-матерей к 21–28 сут. Вполне вероятно, что на протяжении первых 7 сут в процессе плотного контакта с детенышами – носителями аттенуированных бактерий, происходи-

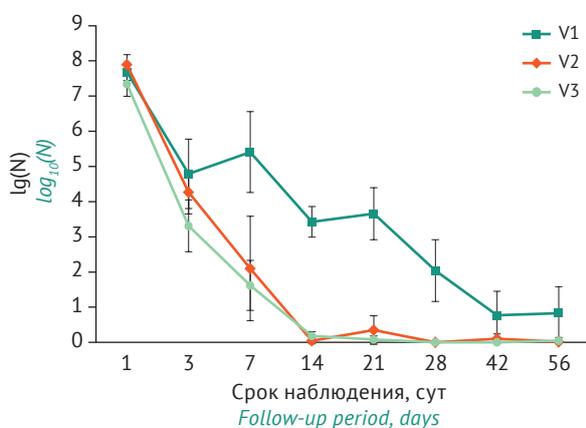


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Динамика размножения (элиминации) аттенуированных бактерий *B. pertussis* в носо/ротоглотке иммунизированных детенышей обезьян после их иммунизации ГамЖВК. По оси X – сроки наблюдения за животными от даты первой иммунизации ГамЖВК. По оси Y – значения логарифма числа геном-эквивалентов ДНК *B. pertussis* в условном миллилитре раствора. V1 – первичная иммунизация, V2 – первая реиммунизация, V3 – вторая реиммунизация детенышей.

Fig. 4. Time-course of reproduction (elimination) of attenuated *Bordetella pertussis* bacteria in the nasopharynx/oropharynx of infant baboons after vaccination with GamLPV. The X-axis shows the period of observation, specifying the time since the first GamLPV administration. The Y-axis shows \log_{10} values of the number of genome equivalents of *B. pertussis* DNA in a conventional mL of solution. V1, V2, and V3 stand for priming, first booster, and second booster vaccination of infant baboons.

ло инфицирование обезьян-матерей, достигшее максимума к 21 сут. Можно ожидать, что в результате передачи и, по-видимому, некоторого размножения аттенуированных бактерий наблюдалась пассивная иммунизация обезьян-матерей после первого введения бактерий детенышам. Наличие специфических антител и ДНК аттенуированных бактерий в организме обезьян-матерей, контактировавших с иммунизированными детенышами, позволило предположить наличие у них иммунитета, сформированного в результате трансмиссии аттенуированных бактерий от иммунизированных детенышей.

Для проверки этих предположений проведен анализ количества ГЭ бактерий *B. pertussis* после инфицирования вирулентными бактериями *B. pertussis* 475 всех участвующих в эксперименте животных (рис. 5).

Следует отметить, что к началу экспериментальной инфекции в аспиратах обезьян ДНК *B. pertussis* не была зарегистрирована. На 14 сут наблюдения у большинства иммунизированных детенышей произошла элиминация бактерий из носоглотки, тогда как у животных контрольной группы того же возраста число бактерий в назофарингеальных аспиратах практически

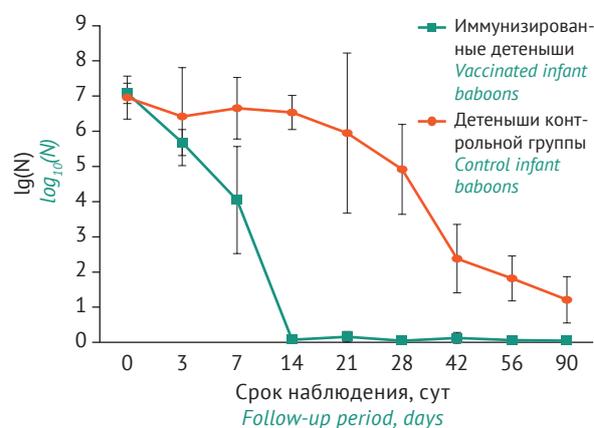


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Динамика размножения (элиминации) вирулентных бактерий *B. pertussis* из носо/ротоглотки иммунизированных детенышей обезьян после экспериментальной инфекции. По оси X – сроки наблюдения за детенышами от даты экспериментальной инфекции. По оси Y – значения логарифма числа геном-эквивалентов ДНК *B. pertussis* в условном миллилитре раствора.

Fig. 5. Time-course of reproduction (elimination) of virulent *Bordetella pertussis* bacteria in the nasopharynx/oropharynx of vaccinated infant baboons after challenge with virulent bacteria. The X-axis shows the period of observation, specifying the time since challenge. The Y-axis shows \log_{10} values of the number of genome equivalents of *B. pertussis* DNA in a conventional mL of solution.

не изменилось (рис. 5). Значительное изменение числа бактерий, исходя из динамики ГЭ ДНК *B. pertussis* у животных контрольной группы, зарегистрировано только на 42 сут после инфекции. ДНК бактерий обнаруживали в аспиратах до конца срока наблюдения.

Аналогичные результаты, полученные при изучении динамики изменения бактериальной нагрузки после экспериментальной инфекции обезьян-матерей и взрослых животных контрольной группы, представлены на рис. 6.

Некоторое отличие состоит в большем сроке элиминации вирулентных бактерий из носоглотки матерей в сравнении с детенышами. У обезьян-матерей ДНК возбудителя не обнаруживали в аспиратах после 21–28 сут, а у детенышей – после 14 сут экспериментальной инфекции. Динамика элиминации бактерий у детенышей контрольной группы и половозрелых особей практически не отличалась. Результаты анализа динамики элиминации аттенуированных и вирулентных бактерий у иммунизированных детенышей и их матерей указывают на значительное сокращение времени их выведения после экспериментальной инфекции иммунизированных детенышей. Большее время выведения вирулентных бактерий из носоглотки контактировавших матерей после экспериментального заражения в сравнении с трехкратно иммунизированными детенышами связано, вероятно, с меньшей напряженностью сформированного в процессе контакта противобактерийного иммунитета по сравнению с прямой иммунизацией.

Общая динамика развития инфекционного процесса и иммунного ответа, вызванного интраназальным введением изогенных вирулентных и аттенуированных бактерий возбудителя коклюша, у детенышей обезьян и половозрелых особей указывает на способность иммунной системы новорожденных детенышей адекватно реагировать на их иммунизацию и последующую экспериментальную инфекцию. В рамках разработанной модели можно ожидать, что схожие иммунные реакции смогут обеспечить защиту детей раннего возраста от размножения вирулентных бактерий, развития симптомов заболевания и распространения коклюшной инфекции.

Совместное содержание детенышей и их матерей, обеспечивающее их тесное общение, приводит к трансмиссии аттенуированных бактерий неиммунизированным матерям. В результате этого формируется иммунная реакция организма матерей, проявляющаяся в выработке специфических антител класса IgG. Сформированный иммунный ответ способен обеспечить защиту обезьян-матерей от экспериментальной инфек-

ции вирулентными бактериями возбудителя коклюша.

Есть основания предполагать, что подобная передача аттенуированных бактерий вакцинного штамма неиммунизированным детям раннего возраста будет иметь место при вакцинации матерей и других членов семьи и обеспечивать пассивную вакцинацию новорожденного с первых дней его жизни. Последующая одно- или двукратная вакцинация младенцев ГамЖВК приведет к формированию устойчивого противобактерийного иммунитета. Разработанный препарат ГамЖВК на основе аттенуированных рекомбинантных бактерий *B. pertussis* является наиболее перспективным для ревакцинации детей и взрослых и формирования коллективного семейного иммунитета против коклюша, так называемого «кокона».

По результатам проведенных доклинических исследований на низших приматах и трех этапов клинических исследований ГамЖВК на взрослых добровольцах получено разрешение Минздрава России на проведение клинических исследований по Протоколу № 04-ГамЖВК-Д1-2023 «Двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое, многоцентровое исследование безопасности и иммуногенности вакцины «ГамЖВК, живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша» у детей в возрасте 14 и 6 лет.

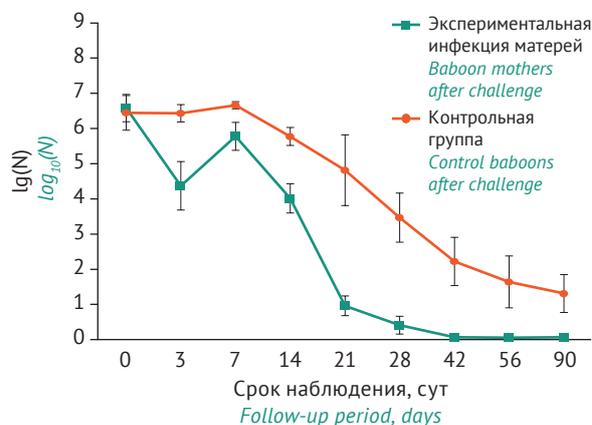


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 6. Динамика размножения (элиминации) вирулентных бактерий *B. pertussis* из носоглотки матерей иммунизированных детенышей. По оси X – сроки наблюдения за матерями от даты экспериментальной инфекции. По оси Y – значения логарифма числа геном-эквивалентов ДНК *B. pertussis* в условном миллилитре раствора.

Fig. 6. Time-course of reproduction (elimination) of virulent *Bordetella pertussis* bacteria in the nasopharynx/oropharynx of baboon mothers of vaccinated infants. The X-axis shows the period of observation, specifying the time since challenge. The Y-axis shows \log_{10} values of the number of genome equivalents of *B. pertussis* DNA in a conventional mL of solution.

ВЫВОДЫ

1. Показана безопасность и хорошая переносимость живой коклюшной вакцины интраназального применения ГамЖВК на экспериментальной модели детенышей обезьян павианов гамадрилов в возрасте 1–1,5 мес.
2. Трансмиссия аттенуированных бактерий *B. pertussis* матерям иммунизированных детенышей не вызвала клинических или лабораторных проявлений коклюша у взрослых особей, контактировавших с иммунизированными детенышами.
3. Экспериментальная инфекция иммунизированных детенышей и матерей вирулентными бактериями возбудителя коклюша не привела к развитию патологического процесса, оцениваемого по состоянию соматического здоровья и лабораторным показателям крови.
4. После первой иммунизации детенышей обезьян павианов гамадрилов аттенуированные бактерии *B. pertussis* регистрируют в носоглотке не менее 60 сут. При повторной иммунизации время выведения бактерий составляет 14–28 сут. Время выведения вирулентных бактерий возбудителя коклюша у иммунизированных детенышей близко ко времени выведения аттенуированных бактерий при повторном введении и составляет 21–28 сут, тогда как время выведения вирулентных бактерий после экспериментального инфицирования неиммунизированных детенышей – более 90 сут.
5. В рамках разработанной модели получены результаты, указывающие на адекватные механизмы формирования противокклюшного иммунитета у детенышей младенческого возраста (1–1,5 мес.) и взрослых животных. Это позволяет ожидать формирования адекватного иммунного ответа у младенцев и детей раннего возраста на интраназальную вакцинацию ГамЖВК, защищающую их от развития симптомов заболевания, размножения вирулентных бактерий и распространения коклюшной инфекции.

Литература/References

1. Macina D, Evans KE. *Bordetella pertussis* in school-age children, adolescents, and adults: a systematic review of epidemiology, burden, and mortality in Africa. *Infect Dis Ther*. 2021;10(3):1097–113. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00442-6>
2. Macina D, Evans KE. *Bordetella pertussis* in school-age children, adolescents and adults: a systematic review of epidemiology and mortality in Europe. *Infect Dis Ther*. 2021;10(4):2071–118. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00520-9>
3. Басов АА, Высокочанская СО, Цвиркун ОВ, Белова ТР, Адугузелов СЭ, Жернов ЮВ и др. Критерии оценки эпидемиологической ситуации коклюша в Российской Федерации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2024;23(1):4–13. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-1-4-13>
4. Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(2):787–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314688110>
5. Семин ЕГ, Синяшина ЛН, Медкова АЮ, Каратаев ГИ. Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* генотипа рtxP3. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;(4):33–41. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-41>
6. Li R, Lim A, Ow ST, Phoon MC, Loch C, Chow VT, et al. Development of live attenuated *Bordetella pertussis* strains expressing the universal influenza vaccine candidate M2e. *Vaccine*. 2011;29(33):5502–11. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.052>
7. Jahnmatz M, Richert L, Al-Tawil N, Storsaeter J, Colin C, Bauduin C, et al. Safety and immunogenicity of the live attenuated intranasal pertussis vaccine BPZE1: a phase 1b, double-blind, randomised, placebo-controlled dose-escalation study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(11):1290–301. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30274-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30274-7)
8. Джидарян АА, Матуа АЗ, Медкова АЮ, Семин ЕГ, Синяшина ЛН, Дьяков ИН и др. Безопасность и иммуногенность препарата живой коклюшной вакцины ГамЖВК интраназального применения на экспериментальной модели детенышей обезьян вида павиан гамадрил. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):203–14. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-190>
9. Кубрава ДТ, Медкова АЮ, Синяшина ЛН, Шевцова ЗВ, Матуа АЗ, Конджария ИГ и др. Экспериментальный коклюш у обезьян. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2013;68(8):28–33. <https://doi.org/10.15690/vramn.v68i8.720>
10. National Research Council (US), Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the care and use of laboratory animals*. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
11. Медкова АЮ, Синяшина ЛН, Румянцева ЮП, Вороница ОЛ, Кунда МС, Каратаев ГИ. Накопление авирулентных инсерционных Bvg-мутантов *Bordetella pertussis*

- при экспериментальной инфекции лабораторных мышей. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013;28(4):22–6.
- Medkova AYu, Sinyashina LN, Rummyantseva YuP, Voronina OL, Kunda MS, Karataev GI. Accumulation of avirulent *Bordetella pertussis* Bvg-mutants in the course of experimental whooping cough in mice. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2013;28(4):156–61. EDN: RTWART
12. Нестерова ЮВ, Медкова АЮ, Бабаченко ИВ, Семин ЕГ, Калисникова ЕЛ, Сияяшина ЛН, Каратаев ГИ. Клинико-диагностическое значение генетических маркеров *Bordetella pertussis* у контактных лиц в семейных очагах. *Журнал инфектологии*. 2019;11(1):17–24. Nesterova YuV, Medkova AYu, Babachenko IV, Semin EG, Kalisnikova EL, Sinyashina LN, Karataev GI. Clinical-diagnostic value of *Bordetella pertussis* genetic markers in contact persons in familial foci. *Journal Infectology*. 2019;11(1):17–24 (In Russ.). <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-17-24>
 13. Медкова АЮ, Сияяшина ЛН, Амичба АА, Семин ЕГ, Шевцова ЗВ, Матуа АЗ и др. Доклинические исследования безопасности, иммуногенности и защитной активности аттенуированных бактерий на экспериментальной модели *Macaca mulatta*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(4):312–23. Medkova AYu, Sinyashina LN, Amichba AA, Semin EG, Shevtsova ZV, Matua AZ et al. Preclinical studies of safety, immunogenicity and protective activity of attenuated *Bordetella pertussis* bacteria on the *Macaca mulatta* model. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(4):312–23 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-3>
 14. Медкова АЮ, Лиджиева АА, Семин ЕГ, Сияяшина ЛН, Сюндюкова РА, Дьяков ИН и др. Клинические исследования безопасности и переносимости живой вакцины интраназального применения для профилактики

коклюша. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):114–9.

Medkova AYu, Lidzhieva AA, Semin EG, Sinyashina LN, Sioundiukova RA, Dyakov IN, et al. A clinical study of the safety and tolerability of live nasal vaccines for the prevention of pertussis. *Drug Development & Registration*, 2021;10(1):114–9 (In Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-114-119>

15. Каратаев ГИ, Сияяшина ЛН, Медкова АЮ, Семин ЕГ, Шевцова ЗВ, Матуа АЗ и др. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis*. *Генетика*. 2016;52(4):422–30.

Karataev GI, Sinyashina LN, Medkova AYu, Semin EG, Shevtsova ZV, Matua AZ et al. Insertional inactivation of virulence operon in population of persistent *Bordetella pertussis* bacteria. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(4):370–7.

<https://doi.org/10.7868/S0016675816030085>

16. Медкова АЮ, Лиджиева АА, Семин ЕГ, Сияяшина ЛН, Сюндюкова РА, Снегирева НА и др. Иммуногенность препарата «Живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша» (ГамЖВК) при однократном применении у здоровых добровольцев. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):706–20.

Medkova AYu, Lidzhiyeva AA, Semin EG, Sinyashina LN, Syundyukova RA, Snegireva NA et al. Immunogenicity of the drug “Live intranasal vaccine for the prevention of pertussis” (GamLPV) with a single use in healthy volunteers. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(6):706–20 (In Russ.).

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-194>

17. Kilgore PE, Salim AM, Zervos MJ, Schmitt HJ. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(3):449–86.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00083-15>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Д.Т. Кубрава** – проведение эксперимента, введение препарата, сбор биоматериала в динамике, постановка и обработка данных реакции агглютинации, написание текста рукописи; **А.Ю. Медкова** – сбор и анализ литературных данных, планирование экспериментов, статистическая обработка данных, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; **А.З. Матуа** – планирование экспериментов, дизайна работы, постановка и обработка данных ИФА; **И.Г. Конджария** – оформление текста рукописи, обсуждение полученных результатов; **А.А. Амичба** – проведение эксперимента, сбор биоматериала; **Х.З. Трапш** – проведение эксперимента, проведение и обработка данных биохимического анализа крови; **Л.В. Гамгия** – проведение эксперимента, проведение и обработка данных общеклинического исследования крови; **С.В. Куликов** – работа с источниками литературы, проведение эксперимента; **Л.Н. Сияяшина** – формирование концепции и дизайна работы, критический анализ результатов исследования; **З.Я. Миквабия** – планирование эксперимента с животными, участие в реализации данного исследования; **Г.И. Каратаев** – формирование концепции, окончательная формулировка выводов, 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. **D.T. Kubrava** conducted the experiments, administered the medicinal product, carried out follow-up sampling, set up agglutination assays, processed the assay data, and drafted the manuscript. **A.Yu. Medkova** collected and analysed literature data, planned the experiments, performed the statistical processing of data, discussed the results of the study, and edited the manuscript. **A.Z. Matua** planned the experiments, designed the study, set up the ELISA experiments, and processed the ELISA data. **I.G. Kondzariya** formatted the manuscript and discussed the results of the study. **A.A. Amichba** conducted the experiments and carried out sampling. **Kh.Z. Trapsh** conducted the experiments, carried out blood biochemistry tests and processed the resulting data. **L.V. Gamgiya** conducted the experiments, carried out complete blood counts and processed the resulting data. **S.V. Kulikov** worked with literature and conducted the experiment. **L.N. Sinyashina** conceptualised and designed the study and critically reviewed the results of the study. **Z.Ya. Mikvabiya** planned the experiments with animals and participated in the conduct of this research. **G.I. Karataev** conceptualised the study, formulated the final conclusions, and approved the final version of the manuscript for publication.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено на заседании приматологической комиссии ГНУ «Института экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии» от 24.12.2019, утверждено как Тема НИР 1.8. «Оценка безопасности и иммуногенности рекомбинантной живой коклюшной вакцины на экспериментальной модели детенышей павианов гамадрил» Академией наук Абхазии.

Ethics approval. The study was approved at the meeting of the primatology commission of the Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia on 24.12.2019. The Academy of Sciences of Abkhazia approved the topic of this study as Research Topic 1.8. 'Evaluation of the safety and immunogenicity of an intranasal recombinant live pertussis vaccine in an infant hamadryas baboon model'.

Об авторах / Authors

Кубрава Дженни Тамазовна / Dzhenni T. Kubrava

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9104-4014>

Медкова Алиса Юрьевна, канд. мед. наук / **Alisa Yu. Medkova**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1509-0622>

Матуа Алиса Зауровна, канд. биол. наук, доц. / **Alice Z. Matua**, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3275-0941>

Конджария Ирина Георгиевна, канд. биол. наук, доц. / **Irina G. Kondzariya**, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3707-4874>

Амичба Астанда Арнольдовна / Astanda A. Amichba

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4986-1392>

Трапш Хамида Зурабовна / Khamida Z. Trapsh

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0976-0770>

Гамгия Лана Валерьяновна / Lana V. Gamgiya

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-8240-8449>

Куликов Сергей Вячеславович / Sergey V. Kulikov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7478-3624>

Синяшина Людмила Николаевна, д-р мед. наук / **Lyudmila N. Sinyashina**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1708-5453>

Миквабия Зураб Ясонович, д-р мед. наук, проф. / **Zurab Ya. Mikvabiya**, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-1436-4824>

Каратаев Геннадий Иванович, д-р биол. наук / **Gennadiy I. Karataev**, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8771-6092>

Поступила 04.06.2024

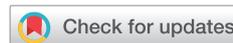
После доработки 09.10.2024

Принята к публикации 06.12.2024

Received 4 June 2024

Revised 9 October 2024

Accepted 6 December 2024



Особенности проведения доклинических и клинических исследований вакцин для профилактики ротавирусной инфекции

А.С. Коровкин , Д.В. Горенков, А.А. Солдатов, В.А. Меркулов

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

 Коровкин Алексей Сергеевич; korovkinas@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Вакцинация признана единственным действенным методом борьбы с ротавирусной инфекцией, которая остается одной из главных причин смертности детей раннего возраста преимущественно в развивающихся странах. В настоящее время в мире существуют доступные ротавирусные вакцины для оральной иммунизации младенцев и продолжаются разработки инновационных типов ротавирусных вакцин, в том числе и российскими учеными. В то же время отсутствуют нормативные правовые акты и рекомендации, позволяющие составить разработчикам оптимальную программу доклинических (ДКИ) и клинических исследований (КИ) ротавирусных вакцин.

ЦЕЛЬ. Изучение и обобщение мирового опыта планирования и проведения доклинических и клинических исследований вакцин против ротавирусной инфекции, который может быть рекомендован отечественным разработчикам.

ОБСУЖДЕНИЕ. Проанализированы доступные данные (в том числе за последние 5 лет) о существующих в мире ротавирусных вакцинах, результаты КИ которых подтвердили их эффективность в предотвращении развития тяжелых ротавирусных гастроэнтеритов и снижении числа госпитализаций по причине острых кишечных инфекций. Эффективность ротавирусных вакцин варьирует в разных регионах мира и может снижаться в развивающихся странах в силу ряда причин. Профиль безопасности оральных ротавирусных вакцин в целом считается благоприятным, однако по-прежнему существуют опасения развития инвагинаций тонкого кишечника у младенцев на фоне вакцинации. Для решения подобных проблем ведется разработка новых типов ротавирусных вакцин, преимущественно инактивированных (субъединичных или рекомбинантных), в том числе и в России. Для планирования и проведения ДКИ могут быть рекомендованы общие подходы с оценкой острой и хронической токсичности, иммуногенности, вируснейтрализующей активности поствакцинальных антител и фармакологической безопасности. При проведении КИ следует предусмотреть оценку профилактической эффективности в целевой группе детей раннего возраста по предотвращению развития ротавирусных гастроэнтеритов различной степени тяжести, числа госпитализаций и общей заболеваемости острыми кишечными инфекциями любой этиологии. Важно подтвердить безопасность и отсутствие взаимного влияния на иммуногенность при одновременном введении ротавирусной вакцины с другими вакцинами национального календаря профилактических прививок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Для проведения ДКИ ротавирусных вакцин могут применяться стандартные и общепринятые подходы, однако планирование и проведение КИ имеет свои особенности, связанные как со спецификой ротавирусной инфекции, так и с особенностями национального календаря профилактических прививок для детей раннего возраста.

Ключевые слова: вакцины; ротавирусная инфекция; ротавирус; доклинические разработки; клинические исследования; национальный календарь профилактических прививок

Для цитирования: Коровкин А.С., Горенков Д.В., Солдатов А.А., Меркулов В.А. Особенности проведения доклинических и клинических исследований вакцин для профилактики ротавирусной инфекции. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(4):377–388. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-377-388>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. А.С. Коровкин является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2024 г. В.А. Меркулов – главный редактор журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2021 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Preclinical and clinical development of preventive rotavirus vaccines: special considerations

Alexey S. Korovkin , Dmitry V. Gorenkov, Aleksandr A. Soldatov, Vadim A. Merkulov

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

 Alexey S. Korovkin; korovkinas@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Vaccination is recognised as the only effective method for preventing rotavirus disease. Rotavirus remains a leading cause of death in young children, mainly, in developing countries. Currently, oral rotavirus vaccines for infant immunisation are available worldwide, and novel types of rotavirus vaccines are also under development, in particular, in the Russian Federation. However, there are no regulations or guidelines helping developers to design an optimal preclinical and clinical programme for rotavirus vaccines.

AIM. This study aimed to analyse and summarise global experience in planning and conducting preclinical and clinical studies of rotavirus vaccines in order to provide recommendations for national vaccine developers.

DISCUSSION. This study presents an analysis of the available data (and, specifically, the data obtained for the past five years) on all rotavirus vaccines used in the world that have been clinically proven to be effective in preventing severe rotavirus gastroenteritis and reducing the number of hospital admissions due to acute intestinal infections. The effectiveness of rotavirus vaccines varies in different regions of the world and may be lower in developing countries for various reasons. The safety profile of oral rotavirus vaccines is generally considered favourable. Nevertheless, there are still some concerns regarding intestinal intussusception in infants following vaccination. To address the abovementioned problems, researchers, including those in Russia, are developing novel types of rotavirus vaccines, predominantly focusing on inactivated (subunit or recombinant) preparations. For planning and conducting preclinical studies of a rotavirus vaccine, it is advisable to adopt general approaches that involve assessing the acute and chronic toxicity, immunogenicity, and safety pharmacology of the rotavirus vaccine and the virus-neutralising activity of vaccination-induced antibodies. Clinical trials of a rotavirus vaccine should assess its effectiveness in preventing rotavirus gastroenteritis of any severity, hospitalisation, and acute viral intestinal infections of any aetiology in the target age group of young children. Furthermore, it is important to confirm the safety of the rotavirus vaccine and demonstrate the absence of mutual interference with the immunogenicity of the rotavirus vaccine and other vaccines co-administered in the vaccination schedule.

CONCLUSIONS. Preclinical studies of rotavirus vaccines may use standard and generally accepted approaches. However, planning and conducting clinical trials requires specific considerations associated with both the nature of rotavirus infection and the national infant vaccination schedule.

Keywords: vaccines; rotavirus infection; rotavirus; preclinical development; clinical trials; national vaccination schedule

For citation: Korovkin A.S., Gorenkov D.V., Soldatov A.A., Merkulov V.A. Preclinical and clinical development of preventive rotavirus vaccines: special considerations. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):377–388. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-377-388>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. A.S. Korovkin has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2024. V.A. Merkulov has been the Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Острые инфекционные диареи и гастроэнтериты, вызываемые ротавирусами группы А, остаются одной из ведущих причин смертности детей первых 5 лет жизни, преимущественно в развивающихся странах [1]. Наиболее высокие показатели детской смертности от инфекционных диарей, включая ротавирусные, приходятся на Индию, Нигерию, Пакистан и Демократическую Республику Конго [2]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует повсеместное включение вакцинации против ротавирусной инфекции в национальные календари профилактических прививок всех государств в приоритетном порядке, независимо от уровня экономического развития и социального благополучия¹. В настоящее время в мире применяются исключительно живые аттенуированные или реассортантные вакцины для оральной иммунизации детей первого года жизни; 4 вакцины прошли преквалификацию ВОЗ. В Российской Федерации зарегистрированы и одобрены к медицинскому применению 2 ротавирусные вакцины – пентавалентные реассортантные вакцины для оральной иммунизации младенцев, поставляемые из Индии и США. К настоящему времени в нашей стране накоплен значительный опыт применения данных вакцин, подтверждающий их благоприятный профиль безопасности и профилактическую эффективность. Была подтверждена значимая эффективность иммунизации, которая при высоком уровне охвата профилактическими прививками выражалась как значимое снижение уровня заболеваемости ротавирусными гастроэнтеритами (РВГЭ) среди привитых детей по сравнению с непривитыми [3].

В России дорожная карта развития системы иммунопрофилактики инфекционных болезней утверждена Распоряжением Правительства РФ от 29 марта 2021 г. № 774-р «Об утверждении Плана мероприятий по реализации Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней до 2035 года»². Согласно Стратегии включение вакцинации против ротавирусной ин-

фекции в национальный календарь профилактических прививок было предусмотрено в 2022 г. Этот план был пересмотрен в соответствии с распоряжением Правительства Российской Федерации от 15 февраля 2023 г. № 343-р, согласно которому массовую вакцинацию детей против ротавирусной инфекции планируется начать в 2025 г.

Для реализации национальной программы иммунизации детей против ротавирусной инфекции в нашей стране могут применяться как уже зарегистрированные вакцины, так и вакцины, находящиеся на различных стадиях разработки после их государственной регистрации и завершения программы доклинической и клинической разработки в достаточном объеме. В настоящее время ведется разработка новых вакцин для профилактики ротавирусной инфекции, в том числе и российскими учеными. При этом отсутствуют нормативные правовые акты и рекомендации, позволяющие составить разработчикам оптимальную программу доклинических (ДКИ) и клинических исследований (КИ) ротавирусных вакцин, которая будет, с одной стороны, обладать достаточным объемом, а с другой стороны, будет являться оптимальной и позволит своевременно реализовать национальную программу иммунизации в нашей стране согласно утвержденной Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней.

Цель работы – изучение и обобщение мирового опыта планирования и проведения доклинических и клинических исследований вакцин против ротавирусной инфекции, который может быть рекомендован отечественным разработчикам.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Особенности доклинических и клинических исследований ротавирусных вакцин

Подходы к проведению доклинических исследований

ВОЗ было разработано руководство по обеспечению качества, безопасности и эффективности

¹ Rotavirus vaccines: WHO position paper. WHO; 2021.

² Распоряжение Правительства РФ от 29.03.2021 № 774-р «Об утверждении Плана мероприятий по реализации Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней до 2035 года».

живых аттенуированных оральных ротавирусных вакцин³, включающее разделы по организации и проведению ДКИ и КИ. Согласно данному документу ДКИ живых оральных ротавирусных вакцин должны проводиться в соответствии с общими рекомендациями ВОЗ по доклиническому изучению иммунобиологических препаратов⁴, однако во внимание следует принимать специфику ротавирусов группы А и особенности соответствующих вакцин.

Оральные ротавирусные вакцины содержат в своем составе либо в составе растворителя (если речь идет о лиофилизированном препарате) антацид для защиты вакцинных штаммов от воздействия кислой среды желудка и обеспечения прохождения штаммов в тонкий кишечник до скопления лимфоидной ткани, где и осуществляется процесс иммунизации. При проведении ДКИ на животных необходимо пероральное введение антацида, используемого для приготовления готовой лекарственной формы вакцины, в полной прививочной дозе, предназначенной для КИ. Например, исследования проводят на мышах или крысах (используя линии животных, восприимчивых к ротавирусам человека), применяя полную прививочную дозу вакцины. Поскольку ротавирусы не обладают нейротропным действием, а штаммы ротавирусов при изготовлении вакцин не пассировались через нервную ткань, проведение теста на нейровирулентность не требуется, как и нет необходимости тестировать посевной или рабочий вирусные банки. Как и в случае со всеми живыми аттенуированными вакцинами, особое внимание следует уделять оценке генетической стабильности штамма с помощью соответствующих анализов *in vitro* и *in vivo*. ДКИ по изучению вирусывыделения у вакцинированных животных не требуются ввиду отсутствия информативности⁵.

Разработчики должны оценивать любые риски для людей или животных на основании литературного анализа, если впоследствии будет подтверждена вероятность реассортации⁶ выделяемого привитыми вакцинного штамма вируса с вирусами дикого типа. Кроме того, патогенетические механизмы инвагинации тонкого кишечника, связанные с пероральной ротавирусной вакцинацией (в среднем, по данным английских исследователей, достигает 31,5 случая на 100 тыс. пациенто-лет

при рутинном применении ротавирусных вакцин [4]), в настоящее время неизвестны, и отсутствует подходящая животная модель для оценки соответствующего риска. Тем не менее по мере развития научных знаний такие модели могут появиться, и разработчикам оральных ротавирусных вакцин следует принимать их во внимание⁷.

При проведении ДКИ следует руководствоваться общими правилами, которые также подразумевают, помимо всего прочего, оценку иммуногенности вакцин-кандидатов. Основной проблемой при изучении иммуногенности ротавирусных вакцин является тот факт, что механизмы формирования специфического иммунитета до сих пор остаются окончательно не изученными, а в отношении вакцин или перенесенной инфекции отсутствуют общепринятые корреляты протекции [5].

В профессиональной литературе практически отсутствует описание результатов ДКИ ротавирусных вакцин. Доступны данные о тестировании главного и рабочего посевного вирусного банков, используемых для производства вакцины во Вьетнаме. Тестирование проведено в соответствии с руководством ВОЗ по разработке аттенуированных ротавирусных вакцин. Главный и рабочий посевные вирусные банки были протестированы на безопасность, токсичность и иммуногенность с использованием нескольких видов животных (морские свинки, мыши, кролики и обезьяны). Иммуногенность изучали на новорожденных обезьянах по показателю трехкратного прироста уровня антител методом снижения бляшкообразующей активности после введения трех вариантов вакцины-кандидата [6]. Все вакцины-кандидаты продемонстрировали трехкратный прирост сывороточных антител после трехкратной иммунизации по сравнению с исходным уровнем. Разработчики ротавирусной вакцины из Индии (Институт сыворотки крови Индии, Serum Institute of India) представили сведения о токсикологических исследованиях пентавалентной реассортантной ротавирусной вакцины (оценка однократной и многократной токсичности у крыс и кроликов при пероральном пути введения), при этом иммунологические свойства вакцины-кандидата авторами не были раскрыты [7].

ДКИ, связанные с изучением вакцин, отличающихся по своим конструктивным особенностям

³ Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral). WHO; 2007.

⁴ Guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO; 2005.

⁵ Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral). WHO; 2007.

⁶ Обмен генетической информацией, приводящий к появлению новых вариантов возбудителя.

⁷ Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral). WHO; 2007.

от рассмотренных в руководстве ВОЗ оральных живых ротавирусных вакцин, должны соответствовать общим рекомендациям по исследованиям токсичности при однократном и многократном введении, иммуногенности, протективной эффективности и фармакологической безопасности⁸ [8].

Опыт проведения клинических исследований ротавирусных вакцин, применяющихся в мире

Используемые в настоящее время ротавирусные вакцины разработаны на основе живых штаммов ротавирусов группы А, подвергшихся аттенуации либо реассортации для приобретения вакцинных свойств. Общая характеристика зарегистрированных ротавирусных вакцин приведена в таблице 1.

Первая в мире оральная живая реассортантная ротавирусная вакцина, разработанная

компанией Wyeth Pharmaceuticals Inc., была одобрена в 1998 г. в США. Однако после выявления ассоциации между повышением частоты развития инвагинаций тонкого кишечника с вакцинацией компания через год приняла решение добровольно отказаться от дальнейших поставок препарата⁹ [12]. Затем живая аттенуированная вакцина с рабочим обозначением RIX4414, разработанная компанией GSK (Бельгия), была в 2006 г. одобрена в странах Европейского союза (ЕС), а в 2008 г. получила одобрение в США¹⁰. Разработанная американской компанией MSD реассортантная живая оральная ротавирусная вакцина WC3 была создана в Вистаровском институте (Wistar Institute) под руководством выдающихся вакцинологов Стэнли Плоткина и Пола Оффита [13]; данный препарат был одобрен к применению в 2006 г. в США¹¹ и в том же году в странах ЕС¹².

Таблица 1. Лицензированные в мире ротавирусные вакцины
Table 1. Globally licensed rotavirus vaccines

Название <i>Name</i>	Страна производства <i>Country of manufacturing</i>	Вид вакцины <i>Vaccine type</i>	Возраст иммунизации <i>Immunisation age</i>	Преквалификация ВОЗ <i>WHO prequalified</i>
RotaTeq (WC3)	США <i>USA</i>	Живая реассортантная пентавалентная <i>Live reassortant pentavalent</i>	С 6 до 32 нед. <i>From 6 to 32 weeks</i>	Да <i>Yes</i>
Rotarix (RIX4414)	Бельгия <i>Belgium</i>	Живая аттенуированная моновалентная <i>Live attenuated monovalent</i>	С 6 до 24 нед. <i>From 6 to 24 weeks</i>	Да <i>Yes</i>
Rotasiil (Рота-В-Эйд, BRV-PV) <i>Rotasiil (Rota-V-Aid, BRV-PV)</i>	Индия <i>India</i>	Живая реассортантная пентавалентная <i>Live reassortant pentavalent</i>	С 6 нед. <i>From 6 weeks</i>	Да <i>Yes</i>
Rotavac (116E)	Индия <i>India</i>	Живая реассортантная моновалентная <i>Live reassortant monovalent</i>	С 6 нед. <i>From 6 weeks</i>	Да <i>Yes</i>
Rotavin	Вьетнам <i>Vietnam</i>	Живая аттенуированная моновалентная <i>Live attenuated monovalent</i>	С 6 до 24 нед. <i>From 6 to 24 weeks</i>	Нет <i>No</i>
Lanzhou lamb rotavirus vaccine (LLR3)	Китай <i>China</i>	Живая аттенуированная моновалентная дженнеровская (штамм ротавируса овец G10P[15]) <i>Live attenuated monovalent Jenner type (lamb rotavirus strain G10P[15])</i>	С 2 до 35 мес. жизни, рекомендуется курс вакцинации завершить до возраста 1 год [11] <i>From 2 to 35 months; it is recommended to complete the vaccination course before the age of 1 year [11]</i>	Нет <i>No</i>

Таблица составлена авторами с использованием источников [9] и [10] / The table is prepared by the authors using sources [9] and [10]

⁸ Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines (CPMP/SWP/465/95). CPMP; 1997. Guideline on clinical evaluation of vaccines (EMA/CHMP/VWP/164653/05 Rev. 1). EMA; 2023. FDA considerations for developmental toxicity studies for preventive and therapeutic vaccines for infectious disease indications. Guidance for industry. FDA; 2006.

Japan Guideline for non-clinical studies of vaccines for preventing infectious diseases (PFSB/ELD Notification No. vaccines p0527-1) (in Japanese).

⁹ Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. CDC; 1999.

¹⁰ Approval History, Letters, Reviews, and Related Documents—Rotarix. FDA; 2008.

¹¹ RotaTeq. Summary Basis for Regulatory Action. FDA; 2017.

¹² RotaTeq Overview. EMA; 2024.

В двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы III вакцины RIX4414 были включены 63225 младенцев, которые случайным образом были распределены на 2 группы: группа с введением двух доз исследуемой вакцины или группа плацебо. Исследуемые препараты вводили с 5 августа 2003 по 12 марта 2004 г. с последующим наблюдением за безопасностью до 23 июля 2004 г. География исследования была довольно обширной и включала детей из Аргентины, Бразилии, Венесуэлы, Доминиканской республики, Гондураса, Мексики, Никарагуа, Панамы, Перу, Финляндии и Чили. Такое число младенцев обеспечило статистическую мощность исследования, достаточную для выявления повышения риска развития инвагинаций тонкого кишечника в группе с введением вакцины по сравнению с группой плацебо.

Включенные в исследование первые 20169 младенцев составляли подгруппу для оценки эффективности вакцины в профилактике ротавирусных гастроэнтеритов и оставались под наблюдением до достижения возраста 1 года [14]. В результате проведенного исследования всего было выявлено 13 случаев развития инвагинаций тонкого кишечника в течение 31 сут после введения каждой из доз вакцины либо плацебо: 6 случаев – в группе с введением вакцины и 7 случаев – в группе плацебо. За время наблюдения детей до достижения ими возраста 1 года в подгруппе оценки эффективности число госпитализаций по поводу ротавирусной инфекции среди привитых детей снизилось на 85% (95% ДИ 69,6–93,5) по сравнению с группой плацебо; число случаев тяжелых ротавирусных гастроэнтеритов среди привитых детей снизилось на 84,7% (95% ДИ 71,7–92,4). Расчетная эффективность вакцинации в отношении тяжелых гастроэнтеритов любой этиологии составила 40% (95% ДИ 27,7–50,4) и предотвращения госпитализаций по причине острых кишечных инфекций (ОКИ) любой этиологии – 42% (95% ДИ 28,6–53,1).

Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы III реассортантной вакцины WC3 проводили в 2001–2004 гг. на территории нескольких государств (Бельгия, Коста-Рика, Финляндия, Германия, Гватемала, Италия, Ямайка, Мексика, Пуэрто-Рико, Швеция, Тайвань и США). Всего в исследование были включены 68038 младенцев (34035 в группе с трехкратным введением вакцины и 34003 в группе плацебо). Наблюдение и сбор сведений о нежелательных явлениях, включая инвагинации тонкого кишечника, осуществляли в течение 42 сут после каждой введенной дозы вакцины или плацебо.

Такое большое число участников исследования было необходимо для обеспечения достаточной статистической мощности исследования, что позволило достоверно оценить риск повышения частоты развития инвагинаций тонкого кишечника на фоне приема вакцины по сравнению с плацебо. Оценку эффективности проводили в течение двух эпидемиологических сезонов по ротавирусной инфекции. Было зарегистрировано 27 случаев кишечных инвагинаций (12 в группе вакцинированных и 15 в группе плацебо) в течение 1 года после введения первой дозы вакцины или плацебо. Все участники исследования были также включены в анализ эффективности вакцины в отношении предотвращения госпитализаций. По результатам исследования число госпитализаций по поводу ротавирусных гастроэнтеритов (РВГЭ), вызванных генотипами ротавируса G1–G4, сократилось среди привитых на 94,5% (95% ДИ 91,2–96,6) по сравнению с группой плацебо, а общее число госпитализаций по поводу всех ОКИ сократилось на 58,9% (95% ДИ 51,7–65,0).

По результатам первого эпидемиологического сезона в подгруппе для оценки эффективности, включавшей 4512 участников (2207 из группы вакцинированных и 2035 из группы плацебо), эффективность вакцины составила 74% (95% ДИ 66,8–79,9) в отношении любых РВГЭ, вызванных генотипами ротавируса G1–G4, и 98% (95% ДИ 88,3–100) в отношении тяжелых форм РВГЭ. По итогам второго эпидемиологического сезона при оценке данных, полученных от 1569 участников (813 из группы вакцинированных и 756 из группы плацебо), эффективность вакцины составила 62,6% (95% ДИ 44,3–75,4) в отношении любых форм РВГЭ, вызванных генотипами ротавируса G1–G4, и 88% (95% ДИ 49,4–98,7) в отношении тяжелых форм РВГЭ [15]. Дополнительно в данном исследовании была проведена оценка иммуногенности по показателям сероконверсии сывороточных IgA к генотипам G1–G4 и P[8]. Уровни сероконверсии составили 95,2% (95% ДИ 91,2–97,8) в группе вакцинированных детей и 14,3% (95% ДИ 9,3–20,7) в группе детей, получивших плацебо.

Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы III индийской ротавирусной вакцины BRV-PV проводили в 6 исследовательских центрах на территории Индии с мая 2014 г. В него были включены 7500 младенцев, распределенных случайным образом на 2 группы: 3749 и 3751 младенец получили исследуемую вакцину и плацебо соответственно. Вакцину трехкратно вводили детям в возрасте

6, 10 и 14 нед. вместе с другими вакцинами национального календаря профилактических прививок. Профилактическая эффективность вакцинации составила 36% в отношении тяжелых форм ротавирусного гастроэнтерита (95% ДИ 11,7–53,6) и достоверно превышала эффективность плацебо (p -значение=0,0067). Профилактическая эффективность вакцинации в отношении тяжелых форм РВГЭ в течение двухлетнего периода наблюдения составила 39,5% (95% ДИ 26,7–50,0) и была достоверно выше эффективности плацебо (p -значение<0,0001). Эффективность применения исследуемой вакцины в предотвращении очень тяжелых форм РВГЭ (сумма баллов по шкале Везикари ≥ 16) составила 60,5% (95% ДИ 17,7–81,0) при первичном анализе и 54,7% (95% ДИ 29,7–70,8) по окончании двухлетнего периода наблюдения. Было зарегистрировано 13 случаев инвагинаций тонкого кишечника (6 – в группе вакцинированных и 7 – в группе плацебо), при этом в течение 28 сут после введения любой из доз вакцины либо плацебо подобных случаев не было зарегистрировано [16].

Другая индийская вакцина, 116Е, также прошла КИ фазы III (двойное слепое плацебо-контролируемое исследование), в которое были включены 6799 младенцев в возрасте 6–7 нед. В группы с введением вакцины и плацебо были случайным образом распределены 4532 и 2267 младенцев соответственно. Вакцину вводили трехкратно в возрасте 6, 10 и 14 нед. Эффективность вакцины в предотвращении развития тяжелых форм РВГЭ при двухлетнем периоде наблюдения составила 55,1% (95% ДИ 39,9–66,4). Было зарегистрировано 8 случаев (0,2%) инвагинаций кишечника в группе вакцинированных и 3 случая (0,1%) в группе плацебо, при этом в течение 30 сут после введения любой из доз вакцины либо плацебо подобных случаев не было зарегистрировано [17].

Доступные сведения о протективной эффективности вьетнамской вакцины в КИ отсутствуют. Тем не менее была опубликована работа V.D. Thiem с соавт. [18] по результатам двойного слепого плацебо-контролируемого КИ фазы III улучшенного варианта готовой лекарственной формы вакцины, не требующей хранения в замороженном виде в отличие от оригинальной лекарственной формы вакцины (транспортируется и хранится при температуре минус 20 °С). В этой работе подтверждена сопоставимость двух вариантов вакцины по параметрам иммуногенности: сероконверсия сывороточных IgA составила 48,25% (95% ДИ 40,59–57,37) в группе с введением улучшенной

готовой лекарственной формы вакцины и 35,04% (95% ДИ 27,34–44,91) в группе с введением исходной готовой лекарственной формы вакцины [19]. В программе КИ вакцины, представленной вьетнамскими разработчиками, отсутствовала оценка клинической эффективности, а регистрация во Вьетнаме была осуществлена на основании первичной оценки безопасности и профиля иммуногенности по сравнению с вакциной RIX4414 [18, 19].

В КИ фазы III (двойное слепое плацебо-контролируемое исследование) вакцины LLR3 были включены 9985 младенцев в возрасте 6–13 нед., случайным образом распределенных в группу с введением 3 доз вакцины с интервалом 1 мес. (4993 участника) и в группу с введением плацебо (4992 участника). Эффективность вакцинации в отношении профилактики развития любых форм РВГЭ составила 56,6% (95% ДИ 50,7–61,8), тяжелых РВГЭ – 70,3% (95% ДИ 60,6–77,6) и госпитализаций – 74% (95% ДИ 57,5–84,1). Сероконверсия при 4-кратном приросте концентрации IgA-антител к ротавирусам генотипов G2, G3 и G4 составила 60,8, 58,0 и 60,6% соответственно (группа вакцинированных) по сравнению с аналогичными показателями 21,35, 22,70 и 23,10% в группе плацебо (p -значение<0,0001 для генотипов G2, G3 и G4). В обеих группах было зарегистрировано по 1 случаю инвагинаций кишечника [20].

Оценка протективной эффективности ротавирусных вакцин

Как было отмечено ранее, мерой оценки эффективности вакцин против ротавирусной инфекции является предотвращение развития ротавирусных гастроэнтеритов, в первую очередь тяжелой степени выраженности. Дополнительными мерами оценки протективной эффективности вакцин являются снижение числа госпитализаций, связанных как с ротавирусными гастроэнтеритами, так и по поводу любых случаев ОКИ; снижение числа случаев очень тяжелых ротавирусных гастроэнтеритов, случаев ротавирусных гастроэнтеритов любой степени тяжести, а также случаев всех ОКИ.

Для оценки степени тяжести ротавирусных гастроэнтеритов у детей применяют 20-балльную шкалу Везикари, представленную в *таблице 2*. Согласно данной шкале тяжелой форме острых вирусных гастроэнтеритов соответствует оценка ≥ 11 баллов, а очень тяжелым формам РВГЭ – оценка ≥ 16 баллов [21].

Считается, что шкала Везикари является достаточно точным методом оценки тяжести ОКИ в остром периоде [22] и потому

Таблица 2. Шкала Везикари для оценки тяжести острых вирусных гастроэнтеритов у детей
Table 2. Vesikari scoring system for assessing the severity of acute viral gastroenteritis in children

Критерии тяжести <i>Severity parameters</i>	Выраженность проявлений заболевания <i>Symptom severity score</i>		
	1 балл <i>1 point</i>	2 балла <i>2 points</i>	3 балла <i>3 points</i>
Длительность диареи (сут) <i>Diarrhoea duration (days)</i>	1–4	5	≥6
Максимальное количество дефекаций за 24 ч <i>Maximum number of stools for 24 h</i>	1–3	4–5	≥6
Длительность сохранения рвоты (сут) <i>Vomiting duration (days)</i>	1	2	≥3
Максимальное количество эпизодов рвоты за 24 ч <i>Maximum number of vomiting episodes for 24 h</i>	1	2–4	≥5
Повышение температуры тела (°C) <i>Fever (°C)</i>	37,1–38,4	38,5–38,9	≥39,0
Дегидратация <i>Dehydration</i>	Отсутствует <i>None</i>	Умеренная <i>Moderate</i>	Умеренная – тяжелая <i>Moderately severe</i>
Лечение <i>Treatment</i>	Регидратация <i>Rehydration</i>	Госпитализация <i>Hospitalisation</i>	Госпитализация <i>Hospitalisation</i>

Таблица составлена авторами с использованием источников [21] и [22] / The table is prepared by the authors using sources [21] and [22]

может использоваться в качестве инструмента для оценки эффективности вакцинации в условиях плацебо-контролируемых и сравнительных КИ.

Оценка иммуногенности ротавирусных вакцин в настоящее время представляется затруднительной именно с точки зрения информативности, поскольку механизмы формирования иммунного ответа при ротавирусной инфекции до сих пор остаются недостаточно изученными, а корреляты протекции окончательно не определены [5]. В то же время в ранее проведенных исследованиях было продемонстрировано нарастание концентрации специфических антител после вакцинации по сравнению с плацебо. Это указывает на возможность проведения сравнительной оценки иммуногенности вакцин, особенно учитывая тот факт, что регуляторный орган Вьетнама (Drug Administration of Vietnam) стал первым, кто зарегистрировал вакцину на основании суррогатных показателей концентрации сывороточных IgA [19]. В целом оценка кишечных IgA, специфичных к ротавирусу, может быть принята в качестве главного коррелята протекции, а сывороточные IgA допустимо рассматривать как суррогатный показатель иммуногенности при введении живых оральных ротавирусных вакцин. Однако имеющихся в настоящее время данных недостаточно для формирования однозначных выводов и рекомендаций [23].

Перспективные разработки ротавирусных вакцин

Преквалификация ВОЗ (услуга, оказываемая ВОЗ для оценки качества, безопасности и эффективности лекарственных препаратов; целью преквалификации является предоставление международным организациям возможности выбора среди широкого ассортимента качественных лекарств для массовых закупок)¹³ выполнена в отношении 4 оральных ротавирусных вакцин. Однако показатели их эффективности могут существенно снижаться в развивающихся странах по сравнению с экономически развитыми государствами вследствие ряда причин, среди которых, как правило, отмечают широкую распространенность грудного вскармливания младенцев, высокую напряженность иммунитета у взрослых, трансплацентарную передачу материнских антител, неполноценное питание, особенности микрофлоры кишечника и сопутствующие инфекционные и паразитарные заболевания, характерные для определенных регионов [7]. Этим обусловлена необходимость поиска новых решений для повышения эффективности программ вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции во всех регионах, в частности посредством разработки новых инактивированных вакцин системного действия [24].

В нашей стране на различных стадиях разработки находятся 3 ротавирусные вакцины, существенно отличающиеся от лицензированных

¹³ Преквалификация лекарственных средств ВОЗ. ВОЗ; 2013.

в мире и преквалифицированных ВОЗ. ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России представил вакцину-кандидат на основе рекомбинантного фьюжн-белка FliCVP6VP8, содержащего иммуногенные эпитопы поверхностных белков VP6 и VP8 ротавируса и бактериальный флагеллин. Препарат содержит также гидроксид алюминия в качестве адъюванта. Рекомбинантный белок продуцируется генно-модифицированными клетками *E. coli* [25].

Сотрудниками ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора также ведется разработка ротавирусных инактивированных вакцин-кандидатов для парентерального введения. В институте были проведены исследования по изучению возможности применения конъюгационных технологий для получения ротавирусной инактивированной вакцины [26, 27].

В ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России была разработана технология бакуловирусной экспрессии белков различных инфекционных возбудителей с последующей сборкой полученных антигенов в вирусоподобные частицы. С применением этой технологии также возможен синтез антигенов ротавирусов группы А. Для включения в состав субъединичной вакцины на основе вирусоподобных нереплицирующихся частиц были выбраны 6 наиболее распространенных в России генотипов ротавирусов группы А по поверхностным белкам VP4 и VP7 (G1, G2, G4, G9, P4, P8), а также включены капсидный белок VP6 и сердцевинный белок VP2. Полученный препарат содержит белки VP4 и VP7 6 генотипов, наиболее часто выявляемых на территории России [28]. Данная вакцина уже прошла первую фазу клинических исследований по изучению иммуногенности, реактогенности и безопасности у здоровых взрослых субъектов¹⁴.

Все вышеперечисленные вакцины-кандидаты являются инактивированными препаратами, предназначенными для парентерального введения, что существенно отличает их от применяющихся в нашей стране и в мире ротавирусных вакцин.

В других странах также ведутся разработки инактивированных ротавирусных вакцин. В частности, организация PATH (Международная некоммерческая организация здравоохранения, Сиэтл, США) завершила фазу I/II двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования с эскалацией дозы субъединичной ротавирусной вакцины для па-

рентерального введения P2-VP8. Исследование было проведено с участием взрослых людей в возрасте 18–45 лет в США и детей в возрасте 2–3 лет и 6–8 нед. в ЮАР. Вакцина представляет собой рекомбинантные капсидные белки VP8 генотипов P[4], P[6] и P[8], полученные методом экспрессии в *E. coli* и адсорбированные на адъюванте гидроксиде алюминия. Несмотря на низкую частоту развития нежелательных явлений после вакцинации, применение вакцины-кандидата P2-VP8 продемонстрировало невысокие показатели сероконверсии сывороточных IgA: 4-кратный прирост был отмечен у 20–34% реципиентов вакцины по сравнению с 9–10% среди реципиентов плацебо в зависимости от исследуемой группы. В то же время введение исследуемой вакцины продемонстрировало 99–100% сероконверсию по уровню прироста типоспецифических IgG к белку VP8 в сравнении с группой плацебо, где уровни сероконверсии составляли 10–29% [29].

В университете Тампере (Финляндия) в настоящее время ведутся разработки инактивированной комбинированной вакцины против ротавирусной инфекции на основе капсидного белка VP6 и норовирусной инфекции на основе вирусоподобных частиц. Ротавирусные и норовирусные белки получены методом бакуловирусной экспрессии. На текущий момент проект находится на стадии доклинических исследований [30].

В Центре контроля и профилактики заболеваний США (Centers for Disease Control, CDC) ведется разработка аттенуированной цельновирионной вакцины для парентерального введения с использованием штамма CDC-9 генотипа G1P[8]. Однако в настоящее время доступны лишь сведения, описывающие эксперименты по проведению адаптации вирусного изолята к росту в культурах перевиваемых клеточных линий и опыты по иммунизации грызунов [31]. В экспериментах на грызунах продемонстрирована иммуногенность вакцины, созданной на основе мРНК-технологии компанией CureVac AG (Германия). По аналогии с вакциной, представленной организацией PATH, мРНК-вакцина включает в себя липидные наночастицы, содержащие мРНК, которые кодируют поверхностные ротавирусные белки VP8 генотипов P[4], P[6] и P[8]. Для усиления иммунного ответа была предложена конструкция «фьюжн-мРНК», содержащая последовательность люмазинсинтазы на 5'-конце гена, кодирующего белок VP8. Такая конструкция мРНК-вакцины индуцировала выраженный иммунный ответ у морских свинок

¹⁴ РКИ № 293. ГРЛС; 2024.

при парентеральном введении, в том числе образование антител с вируснейтрализующей активностью [32].

Таким образом, спектр разрабатываемых ротавирусных вакцин в настоящее время довольно широк, однако практически все проекты находятся на начальных этапах реализации и требуют завершения полноценных доклинических и клинических исследований для подтверждения безопасности и эффективности вакцин-кандидатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного анализа были рассмотрены рекомендации ВОЗ по проведению ДКИ ротавирусных вакцин. Однако данные рекомендации касаются в первую очередь живых оральных ротавирусных вакцин. При планировании ДКИ инактивированных ротавирусных вакцин необходимо учитывать общие подходы, связанные с оценкой острой и хронической токсичности, иммуногенности, вируснейтрализующей активности антител и фармакологической безопасности.

Изученный опыт проведения базовых КИ вакцин, одобренных к применению в мире, продемонстрировал единообразный подход к выбору конечных точек и методологии проведения исследований. При оценке эффективности ротавирусных вакцин в условиях контролируемых КИ основной задачей является демонстрация преимущества исследуемых вакцин перед плацебо в способности влиять на снижение числа регистрируемых случаев ротавирусных гастроэнтеритов (включая тяжелые и очень тяжелые случаи) и числа госпитализаций. Учитывая высокую эпидемиологическую значимость ротавирусов среди возбудителей острых кишечных инфекций у детей раннего возраста и их доминирующее положение в данной возрастной группе, закономерным является также продемонстрированное снижение общей заболеваемости острыми кишечными инфекциями в ряде исследований. Также целесообразным является

оценка сохранения защитного эффекта ротавирусных вакцин в течение нескольких эпидемиологических сезонов.

Помимо оценки эффективности вакцин в контролируемых условиях необходима оценка безопасности с учетом риска развития кишечных инвагинаций, которые потенциально могут регистрироваться на фоне применения оральных живых ротавирусных вакцин, в связи с чем в КИ таких препаратов должно быть включено достаточное число участников, что обеспечит статистическую мощность исследования и позволит выявить повышение риска развития инвагинаций в группе привитых по сравнению с плацебо. Вопрос относительно мониторинга развития инвагинаций кишечника в целом может быть снят в отношении инактивированных вакцин для парентерального применения, которые активно разрабатываются в настоящее время в разных странах, в том числе и в Российской Федерации.

Таким образом, разрабатываемые инактивированные ротавирусные вакцины для парентерального введения следует надлежащим образом изучить в ходе проведения ДКИ. После этого потребуется проведение нескольких этапов КИ по оценке безопасности и подбору дозы на начальных этапах с участием взрослых субъектов и последующим изучением безопасности и эффективности в профилактике ротавирусных гастроэнтеритов и оценке частоты госпитализаций по сравнению с плацебо в целевой группе детей раннего возраста. Также важным этапом в КИ новых вакцин, в том числе инактивированных ротавирусных препаратов для парентерального введения, является оценка одновременного введения экспериментальной вакцины с другими вакцинами национального календаря профилактических прививок, рекомендованными для данного возраста, для подтверждения безопасности совместного применения и отсутствия взаимного влияния на формирование поствакцинального иммунитета.

Литература/References

1. Du Y, Chen C, Zhang X, Yan D, Jiang D, Liu X, et al. Global burden and trends of rotavirus infection-associated deaths from 1990 to 2019: an observational trend study. *Viral J*. 2022;19(1):166. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01898-9>
2. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000–2013. *Clin Infect Dis*. 2016;62 Suppl 2:S96–S105. <https://doi.org/10.1093/cid/civ1013>
3. Коровкин АС, Игнатьев ГМ. Результаты и перспективы вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции в Российской Федерации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):499–512.
4. Korovkin AS, Ignatyev GM. Results and prospects of rotavirus immunisation in the Russian Federation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):499–512 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-499-512>
5. McGeoch LJ, Finn A, Marlow RD. Impact of rotavirus vaccination on intussusception hospital admissions in England. *Vaccine*. 2020;38(35):5618–26. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.078>
6. Latifi T, Kachooei A, Jalilvand S, Zafarian S, Roohvand F,

- Shoja Z. Correlates of immune protection against human rotaviruses: natural infection and vaccination. *Arch Virol*. 2024;169(3):72. <https://doi.org/10.1007/s00705-024-05975-y>
6. Luan LT, Trang NV, Phuong NM, Nguyen HT, Ngo HT, Nguyen H, et al. Development and characterization of candidate rotavirus vaccine strains derived from children with diarrhoea in Vietnam. *Vaccine*. 2009;27:F130–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.086>
 7. Zade JK, Kulkarni PS, Desai SA, Sabale RN, Naik SP, Dhare RM. Bovine rotavirus pentavalent vaccine development in India. *Vaccine*. 2014;32 Suppl 1:A124–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.003>
 8. Горенков ДВ, Комаровская ЕИ, Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Бондарев ВП. Современные нормативные требования к проведению доклинических исследований профилактических вакцин. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):7–25. Gorenkov DV, Komarovskaya EI, Soldatov AA, Avdeeva Zhl, Bondarev VP. Current regulatory requirements for non-clinical evaluation of prophylactic vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):7–25 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-7-25>
 9. Skansberg A, Sauer M, Tan M, Santosham M, Jennings MC. Product review of the rotavirus vaccines ROTASII, ROTAVAC, and Rotavin-M1. *Hum Vaccin Immunother*. 2021;17(4):1223–34. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1804245>
 10. Burke RM, Tate JE, Kirkwood CD, Steele AD, Parashar UD. Current and new rotavirus vaccines. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(5):435–444. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000572>
 11. Li J, Zhang Y, Yang Y, Liang Z, Tian Y, Liu B, et al. Effectiveness of Lanzhou lamb rotavirus vaccine in preventing gastroenteritis among children younger than 5 years of age. *Vaccine*. 2019;37(27):3611–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.03.069>
 12. Rosillon D, Buysse H, Friedland LR, Ng SP, Velázquez FR, Breuer T. Risk of intussusception after rotavirus vaccination: meta-analysis of postlicensure studies. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(7):763–8. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000000715>
 13. Clark HF, Offit PA, Ellis RW, Eiden JJ, Krah D, Shaw AR, et al. The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. *J Infect Dis*. 1996;174 Suppl 1:S7380. https://doi.org/10.1093/infdis/174.supplement_1.s73
 14. Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med*. 2006;354(1):11–22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052434>
 15. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med*. 2006;354(1):23–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052664>
 16. Kulkarni PS, Desai S, Tewari T, Kawade A, Goyal N, Garg BS, et al. A randomized phase III clinical trial to assess the efficacy of a bovine-human reassortant pentavalent rotavirus vaccine in Indian infants. *Vaccine*. 2017;35(45):6228–37. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.014>
 17. Bhandari N, Rongsen-Chandola T, Bavdekar A, John J, Antony K, Taneja S, et al. Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian children in the second year of life. *Vaccine*. 2014;32 Suppl 1:A110–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.079>
 18. Thiem VD, Anh DD, Ha VH, Hien ND, Huong NT, Nga NT, et al. Safety and immunogenicity of two formulations of rotavirus vaccine in Vietnamese infants. *Vaccine*. 2021;39(32):4463–70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.06.056>
 19. Dang DA, Nguyen VT, Vu DT, Nguyen TH, Nguyen DM, Yuhuan W, et al. A dose-escalation safety and immunogenicity study of a new live attenuated human rotavirus vaccine (Rotavin-M1) in Vietnamese children. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 1:A114–21. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.118>
 20. Xia S, Du J, Su J, Liu Y, Huang L, Yu Q, et al. Efficacy, immunogenicity and safety of a trivalent live human-lamb reassortant rotavirus vaccine (LLR3) in healthy Chinese infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Vaccine*. 2020;38(46):7393–400. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.04.038>
 21. Schnadower D, Tarr PI, Gorelick MH, O'Connell K, Roskind CG, Powell EC, et al. Validation of the modified Vesikari score in children with gastroenteritis in 5 US emergency departments. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;57(4):514–9. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31829ae5a3>
 22. Ермоленко КД, Гончар НВ, Бехтерева МК, Лобзин ЮВ. Сравнение информативности шкал Везикари и Кларка для определения тяжести вирусных кишечных инфекций и прогнозирования их исходов у детей. *Журнал инфектологии*. 2018;10(4):64–71. Ermolenko KD, Gonchar NV, Behtereva MK, Lobzin YuV. Comparison of Vesikari and Clark scale for determination of viral intestinal infections severity and predicting their outputs in children. *Journal Infectology*. 2018;10(4):64–71 (In Russ.). <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2018-10-4-64-71>
 23. Plotkin SA. Recent updates on correlates of vaccine-induced protection. *Front Immunol*. 2023;13:1081107. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1081107>
 24. Fix A, Kirkwood CD, Steele D, Flores J. Next-generation rotavirus vaccine developers meeting: summary of a meeting sponsored by PATH and the Bill & Melinda Gates Foundation (19–20 June 2019, Geneva). *Vaccine*. 2020;38(52):8247–54. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.034>
 25. Духовлинов ИВ, Богомолова ЕГ, Федорова ЕА, Симбирцев АС. Исследование протективной активности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8. *Медицинская иммунология*. 2016;18(5):417–24. Dukhovlinov IV, Bogomolova EG, Fedorova EA, Simbirtsev AS. Protective activity study of a candidate vaccine against rotavirus infection based on recombinant protein FliCVP6VP8. *Medical Immunology (Russia)*. 2016;18(5):417–24 (In Russ.). <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-417-424>
 26. Яговкин ЭА, Решетов АА, Колпакова ЕП, Ковришко МВ, Ванжа ВС, Троценко АА. Изучение возможности применения конъюгационных технологий при разработке ротавирусной инактивированной вакцины. В кн.: *Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на Юге России. Ермольевские чтения*. Ростов-на-Дону: Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии; 2021. С. 154–8. Yagovkin EA, Reshetov AA, Kolpakova EP, Kovrizhko MV, Vanzha VS, Trotsenko AA. Study of the possibility of using conjugation technologies in the development of a rotavirus inactivated vaccine. In: *Topical issues of epidemiological surveillance of infectious and parasitic diseases in the South of Russia. Ermolyeva Readings*. Rostov-on-Don: Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology; 2021. P. 154–8 (In Russ.). EDN: [YNTIDR](https://yntidr.ru)
 27. Колпакова ЕП, Колпаков СА. Способ инактивации

- культурального ротавируса человека. Патент Российской Федерации № 2743300; 2021.
Kolpakova EP, Kolpakov SA. Method of human culture rotavirus inactivation. Patent of the Russian Federation No. 2743300; 2021.
EDN: [VLTMMH](#)
28. Черепушкин СА, Цибезов ВВ, Южаков АГ, Латышев ОЕ, Алексеев КП, Алтаева ЭГ и др. Синтез и характеристика вирусоподобных частиц ротавируса А (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) человека. *Вопросы вирусологии*. 2021;66(1):55–64.
Cherpushkin SA, Tsibezov VV, Yuzhakov AG, Latyshev OE, Alekseev KP, Altayeva EG, et al. Synthesis and characterization of human rotavirus A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) virus-like particles. *Problems of Virology*. 2021;66(1):55–64 (In Russ.).
<https://doi.org/10.36233/0507-4088-27>
29. Groome MJ, Fairlie L, Morrison J, Fix A, Koen A, Masenya M, et al. Safety and immunogenicity of a parenteral trivalent P2-VP8 subunit rotavirus vaccine: a multisite, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(7):851–63.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30001-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30001-3)
30. Malm M, Diessner A, Tamminen K, Liebscher M, Vesikari T, Blazevic V. Rotavirus VP6 as an adjuvant for bivalent norovirus vaccine produced in *Nicotiana benthamiana*. *Pharmaceutics*. 2019;11(5):229.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050229>
31. Resch TK, Wang Y, Moon S, Jiang B. Serial passaging of the human rotavirus CDC-9 strain in cell culture leads to attenuation: characterization from *in vitro* and *in vivo* studies. *J Virol*. 2020;94(15):e00889-20.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00889-20>
32. Roier S, Mangala Prasad V, McNeal MM, Lee KK, Petsch B, Rauch S. mRNA-based VP8* nanoparticle vaccines against rotavirus are highly immunogenic in rodents. *NPJ Vaccines*. 2023;8(1):190.
<https://doi.org/10.1038/s41541-023-00790-z>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.С. Коровкин** — концепция работы, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **Д.В. Горенков** — обработка и анализ данных литературы, написание текста рукописи; **А.А. Солдатов** и **В.А. Меркулов** — критическое обсуждение и редактирование текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.S. Korovkin** conceptualised the study and approved the final version of the manuscript for publication. **D.V. Gorenkov** reviewed and analysed published data and drafted the manuscript. **A.A. Soldatov** and **V.A. Merkulov** critically discussed and edited the manuscript.

Об авторах / Authors

Коровкин Алексей Сергеевич, канд. мед. наук / **Alexey S. Korovkin**, Cand. Sci. (Med.)

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

Горенков Дмитрий Витальевич / **Dmitry V. Gorenkov**

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

Солдатов Александр Алексеевич, д-р мед. наук / **Aleksandr A. Soldatov**, Dr. Sci. (Med.)

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

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. / **Vadim A. Merkulov**, Dr. Sci. (Med.), Prof.

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

Поступила 03.07.2024

После доработки 01.11.2024

Принята к публикации 06.12.2024

Received 3 July 2024

Revised 1 November 2024

Accepted 6 December 2024



Определение специфической активности ротавирусной вакцины на основе вирусоподобных частиц с использованием иммуоферментного анализа: разработка и валидация методики

И.Е. Филатов , М.М. Силаенкова, В.В. Цибезов, М.В. Баландина, С.Н. Норкина, О.Е. Латышев, О.В. Елисеева, С.А. Черепушкин, Т.В. Гребенникова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Гамалеи, д. 18, Москва, 123098, Российская Федерация

✉ Филатов Илья Евгеньевич; flat69rus@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Создание вакцин на основе вирусоподобных частиц (virus-like particles, VLP), состоящих из рекомбинантных белков ротавируса типа А человека, имитирующих структуру нативного вируса, но не обладающих инфекционной активностью, является перспективным направлением для вакцинопрофилактики. Для оценки специфической активности таких вакцин оптимальным представляется применение метода иммуоферментного анализа (ИФА) для определения титра специфических IgG-антител к белкам ротавируса А в образцах сыворотки крови иммунизированных животных.

ЦЕЛЬ. Разработка и валидация методики оценки специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP с использованием метода ИФА для определения уровня антител к белкам VP2/6 ротавируса А в образцах сыворотки крови иммунизированных морских свинок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Оценка специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP проводили *in vivo* с использованием трех видов экспериментальных животных: мышей линии BALB/c, морских свинок породы агути и новорожденных карликовых свиней. Вакцину в дозе 30 мкг вводили животным трехкратно внутримышечно. Оценивали уровни специфических иммуноглобулинов класса G (IgG) к белкам VP2/6 ротавируса А и вируснейтрализующих антител (ВНА) в образцах сыворотки крови животных методом непрямого ИФА и в реакции нейтрализации соответственно. Определяли среднее геометрическое значение титров (СГТ) антител. Валидацию методики оценки специфической активности проводили на двух сериях вакцины с использованием стандартных методов статистического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Проведено сравнение уровней специфических IgG-антител к белкам VP2/6 и ВНА к ротавирусу типа А через 14 сут после первой, второй и третьей иммунизаций. Значительное увеличение титра антител и статистически значимые различия ($p < 0,05$) между группами наблюдались уже после второй иммунизации. Двукратная иммунизация вакциной приводила к образованию IgG-антител и ВНА у новорожденных карликовых свиней (СГТ антител – 200,0 и 108,9 соответственно) и морских свинок (СГТ антител – 12800 и 2600 соответственно). У иммунизированных мышей наблюдался значительный рост уровня специфических IgG-антител (СГТ – 572440). В качестве релевантной модели для валидации методики ИФА для определения специфической активности были выбраны морские свинки при использовании двукратной схемы иммунизации. По результатам валидационных испытаний двух серий вакцины установлено, что метод ИФА удовлетворял

критериям приемлемости по характеристикам: специфичность, повторяемость (коэффициент вариации не более 15% – для 1 и 2 серий вакцины 12,4 и 7,7%) и промежуточная прецизионность (коэффициент вариации не более 15% – для 1 и 2 серий вакцины 6,9 и 10,2%).
ВЫВОДЫ. Разработана и валидирована методика оценки специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP с использованием ИФА. Метод ИФА может быть использован для контроля показателя качества «Специфическая активность» ротавирусной вакцины на основе VLP.

Ключевые слова: ротавирус типа А человека; вирусоподобные частицы; VLP; ротавирусная вакцина; специфическая активность; иммуноферментный анализ; реакция нейтрализации; валидация; *in vivo*

Для цитирования: Филатов И.Е., Силаенкова М.М., Цибезов В.В., Баландина М.В., Норкина С.Н., Латышев О.Е., Елисеева О.В., Черепушкин С.А., Гребенникова Т.В. Определение специфической активности ротавирусной вакцины на основе вирусоподобных частиц с использованием иммуноферментного анализа: разработка и валидация методики. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2024;24(4):389–402. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-389-402>

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственной тематики Минздрава России «Разработка подходов для создания вакцины против инфекции, вызванной ротавирусом типа «А» (регистрационный номер АААА-А18-118051490143-3).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Enzyme-linked immunosorbent assay to determine the potency of a rotavirus vaccine based on virus-like particles: analytical procedure development and validation

Ilya E. Filatov [✉], Maria M. Silaenkova, Valeriy V. Tsibezov, Marina V. Balandina, Svetlana N. Norkina, Oleg E. Latyshev, Olesja V. Eliseeva, Stanislav A. Cherepushkin, Tatyana V. Grebennikova

National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya, 18 Gamaleya St., Moscow 123098, Russian Federation

✉ Ilya E. Filatov; filat69rus@yandex.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Rotavirus vaccines based on virus-like particles (VLPs), non-infectious recombinant proteins of human rotavirus A that mimic the structure of the native virus, show promise for preventive vaccination. Presumably, the optimal method to determine the potency of VLP-based rotavirus vaccines is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method used to measure the titre of specific IgG antibodies to rotavirus A proteins in serum samples from vaccinated animals.

AIM. This study aimed at assessing the potency of a VLP-based rotavirus vaccine by developing and validating an analytical procedure using ELISA to determine the levels of antibodies to the VP2 and VP6 proteins of rotavirus A in serum samples from vaccinated guinea pigs.

MATERIALS AND METHODS. The potency of the VLP-based rotavirus vaccine was determined *in vivo* in three types of experimental animals, including BALB/c mice, agouti guinea pigs, and newborn minipigs. The animals received three intramuscular injections of the vaccine at a dose of 30 µg. This study used the indirect ELISA method to quantify VP2- and VP6-specific immunoglobulin G (IgG) antibodies and the virus-neutralisation test to measure neutralising antibodies (nAbs) to rotavirus A in animal serum samples. The study involved calculating the geometric mean titres (GMTs) of antibodies. The authors validated the analytical procedure for potency assessment on two batches of the vaccine using standard statistical analysis methods.

RESULTS. The study compared VP2- and VP6-specific IgG and nAb levels 14 days after the first, second, and third vaccinations. The authors observed a significant increase in antibody titres and statistically significant ($p < 0.05$) differences between groups as early as after the second vaccination. Double vaccination induced rotavirus-specific IgGs and nAbs in newborn minipigs (GMTs of 200.0 and 108.9, respectively) and guinea pigs (GMTs of 12,800 and 2,600, respectively). Vaccinated mice demonstrated a significant increase in rotavirus-specific IgG levels (GMT of 572,440). Guinea pigs were selected as a relevant model for validating the ELISA-based potency assessment procedure. The validation study used a double vaccination scheme. The validation using two batches of the VLP-based rotavirus vaccine indicated that the ELISA-based analytical procedure met the acceptance criteria for specificity, repeatability, and intermediate precision. The repeatability assessment resulted in a coefficient of variation (CV) of 12.4% for batch 1 and a CV of 7.7% for batch 2, whereas the intermediate precision assessment showed a CV of 6.9% for batch 1 and a CV of 10.2% for batch 2, which were within the acceptance criteria for both validation parameters ($CV \leq 15\%$).

CONCLUSIONS. The authors developed and validated an ELISA-based analytical procedure for assessing the potency of VLP-based preventive rotavirus vaccines. According to the study results, ELISA is applicable to the control of the potency of VLP-based preventive rotavirus vaccines.

Keywords: human rotavirus A; virus-like particles; VLP; rotavirus vaccine; potency; enzyme-linked immunosorbent assay; virus neutralisation test; validation; *in vivo*

For citation: Filatov I.E., Silaenkova M.M., Tsibezov V.V., Balandina M.V., Norkina S.N., Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Cherepushkin S.A., Grebennikova T.V. Enzyme-linked immunosorbent assay to determine the potency of a rotavirus vaccine based on virus-like particles: analytical procedure development and validation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):389–402. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-389-402>

Funding. The study was conducted as part of the State Programme of the Ministry of Health of the Russian Federation 'Development of approaches to create a vaccine against rotavirus A infection' (registration No. AAAA-A18-118051490143-3).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Ротавирусная инфекция (РВИ) человека представляет собой распространенное заболевание, вызванное ротавирусами типов А, В и С [1]. Наиболее частой причиной диареи у детей первых лет жизни являются ротавирусы типа А. Ежегодно в мире регистрируется около 1,8 млн случаев госпитализации детей с РВИ [2], из которых почти 130 тыс. заканчиваются летальным исходом [3]. На территории Российской Федерации в 2022 г. 49% случаев острых кишечных инфекций пришлось на РВИ. На 100 тыс. населения заболеваемость составила около 62 человек. Наиболее подверженными заболеванию оказались дети в возрасте до двух лет¹.

В настоящее время единственным эффективным методом борьбы с заболеваемостью РВИ является вакцинопрофилактика. На территории Российской Федерации одобрены две вакцины для профилактики ротавирусной инфекции, пентавалентные, живые. Ротавирусные вакцины российского производства отсутствуют. Следует отметить, что использование живых

ротавирусных вакцин первого поколения может быть ограничено, поскольку при широком охвате вакцинацией выявлены случаи таких нежелательных явлений, как инвагинация кишечника [4]. Перспективным направлением разработки вакцин представляется создание препарата на основе вирусоподобных частиц (virus-like particles, VLP). VLP, сформированные рекомбинантными белками, имитируют структуру нативного ротавируса и обладают высокой иммуногенностью. Небольшой размер (60–80 нм) позволяет им проникать в лимфу через поры стенок лимфатических сосудов и далее во вторичные лимфоидные органы с последующей активацией Т- и В-клеток [5, 6]. VLP могут содержать поверхностные эпитопы различных генотипов вируса, что способствует выработке антител широкого спектра действия и формированию устойчивого гуморального или клеточного иммунного ответа в организме хозяина. Вакцины на основе VLP стимулируют В- и Т-лимфоциты по механизму, похожему на действие вируса, попавшего в организм хозяина [7, 8]. VLP свободны

¹ О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году: Государственный доклад. М.: Роспотребнадзор; 2023. https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=25076

от инфекционной вирусной РНК и не могут реплицироваться в клетках, что имеет важное значение, учитывая риск возникновения вирусных ревертантов в случае применения живых аттенуированных вакцин [9]. Кроме того, защитный эффект VLP наблюдается при более низких дозах, что позволяет значительно снизить затраты на производство вакцины [8].

Согласно регуляторным требованиям к иммунобиологическим лекарственным препаратам, в том числе вакцинам, их качество должно соответствовать комплексу показателей на всех этапах производства препарата². Одним из основных показателей качества является специфическая активность [10]. Для оценки этого показателя используют в том числе методы *in vivo*, основанные на определении иммунологического ответа у экспериментальных животных, привитых исследуемыми препаратами. В качестве модельных используют виды животных, максимально восприимчивых к изучаемому вирусу, у которых патогенез инфекционного процесса наиболее сходен с человеком³. Выбор для оценки иммуногенности VP2/6 был обоснован тем, что белок VP6 является основным высококонсервативным группоспецифическим белком вириона, а использование в качестве антигена в ИФА смеси белков VP2 и VP6 увеличивает чувствительность тест-системы на 15–30% [11].

Одной из наиболее релевантных моделей являются новорожденные поросята карликовых свиней, использование которых показало эффективность при оценке иммуногенности и протективной активности ротавирусных вакцин, что обусловлено значительным сходством в физиологическом развитии, анатомических аспектах и механизмах формирования системного и местного иммунитета младенцев и новорожденных поросят [12]. Однако их использование в качестве модели для контроля специфической активности вакцин при их серийном производстве является дорогостоящим и трудоемким процессом. В связи с этим представляется актуальной разработка метода определения данного показателя с использованием доступных видов лабораторных животных, в частности морских свинок.

Цель работы – разработка и валидация методики оценки специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP с использованием метода ИФА для определения уровня

антител к белкам VP2/6 ротавируса А в образцах сыворотки крови иммунизированных морских свинок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использовали разработанную в ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) кандидатную вакцину против ротавируса человека типа А на основе вирусоподобных частиц, включающих рекомбинантные белки VP2, VP4, VP6, VP7 генотипов G1, G2, G4, G9, P4, P8, синтезированные в бакуловирусной системе экспрессии, с адъювантом на основе сквалена [11]. Были использованы две серии вакцины. Препараты представляли собой эмульсию для внутримышечного введения с содержанием антигена 30 мкг/доза, объем дозы 0,5 мл. В качестве контроля применяли натрия хлорид-СОЛОфарм, раствор для инфузий 0,9% (ООО «Гротекс», Россия).

Экспериментальные животные

В исследовании использовали мышей линии BALB/c (самки массой 14–16 г); морских свинок породы агути (самки массой 300–350 г). Животные получены из питомника ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, филиал «Столбовая». В работе использовали новорожденных поросят карликовых свиней (АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Россия) от свиноматок, не имеющих специфических антител к ротавирусу А человека. Возраст поросят на момент первой иммунизации составлял 4–5 сут. В течение периода исследования животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде.

Протокол исследования с использованием экспериментальных животных был одобрен биоэтической комиссией АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (№ БЭК 1.42/22 от 21.09.2022) и локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (№ 05/2022 от 06.10.2022). Эксперименты с животными, в том числе процедуру эвтаназии, проводили в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных,

² ОФС.1.71.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К.; 2012. Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 2. М.: Гриф и К.; 2012.

используемых в научных целях⁴, а также в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Методы

Иммунизация. Животных делили на опытные и контрольные группы по 5 особей в каждой. Мышам и морским свинкам в опытных группах вакцину в дозе 30 мкг вводили трехкратно внутримышечно с интервалом 10–14 сут, новорожденным карликовым свиньям – с интервалом 9–10 сут. Животным контрольных групп вводили 0,9% раствор натрия хлорида аналогичным способом. Отбор крови проводили через 10–14 сут после каждой иммунизации в сухие чистые пробирки без антикоагулянта. Пробирки с кровью выдерживали в термостате при 37 °С в течение 30 мин, отделяли образовавшийся сгусток крови, центрифугировали при 1100 об/мин в течение 10 мин (5430 G, Eppendorf, США) и аккуратно отбирали надосадочную жидкость в чистые пробирки. Гемолизированные образцы исключали из исследования.

Иммуноферментный анализ. Для определения титра специфических иммуноглобулинов IgG к белкам VP2/6 в сыворотке крови иммунизированных животных использовали метод непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). В лунки иммунологического 96-луночного планшета (Greiner, Германия) вносили 0,1 мл очищенных белков VP2/6 (5 мкг/мл) в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9,5. Планшет инкубировали 18 ч при 4 °С, после чего удаляли избыток антигена четырехкратной отмывкой фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,1% Твин-20, ФСБТ (pH 7,4). Блокирование свободных участков связывания проводили 1% желатином (GERBU Biotechnik, Германия) в ФСБТ в течение 1 ч при 37 °С, далее удаляли раствор и вносили в лунки по 0,1 мл исследуемых сывороток в различных разведениях в ФСБТ с содержанием 0,5% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США), ФСБТ-БСА. Планшет инкубировали 1 ч при 37 °С, промывали ФСБТ и добавляли 0,1 мл меченых пероксидазой антител к IgG мыши, морской свинки или свиньи (Sigma, США) в ФСБТ-БСА. Через 1 ч инкубации при 37 °С планшет отмывали ФСБТ и вносили в лунки 0,1 мл субстратного раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ООО «Хема», Россия), далее проводили инкубацию 15 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 0,05 мл 1М серной кислоты. Оптическую

плотность определяли с использованием спектрофотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀) [11]. За титр антител принимали разведение, в котором значение ОП₄₅₀ образца сыворотки в 2 раза превышало значение ОП₄₅₀ отрицательного контроля (сыворотка крови неиммунизированного животного).

Реакция нейтрализации. Определение уровня вируснейтрализующих антител (ВНА) к ротавирусу типа А проводили в реакции нейтрализации *in vitro* классическим методом [13]. Для постановки реакции использовали перевиваемую культуру клеток почки африканской зеленой мартышки MARC-145, полученную из коллекции культур клеток ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Клетки культивировали в 96-луночном планшете в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 5% фетальной сыворотки при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Исследуемые образцы сыворотки предварительно термически инактивировали при 56 °С в течение 30 мин, затем готовили двукратные последовательные разведения образцов (начальное разведение – 1:100) в среде DMEM с глутамином («ПанЭко», Россия). Ко всем разведениям сыворотки добавляли аттенуированный штамм Wa G1P[8] ротавируса человека, любезно предоставленный профессором L.J. Saif (OARDC, FAHRP, университет штата Огайо, США) [12], титр которого по уровню показателя 50% тканевой цитопатической дозы (ТЦД₅₀) составлял 5,5 lg ТЦД₅₀/0,1 мл (100 ТЦД₅₀/лунку). Разведение вируса готовили в питательной среде, содержащей 10 мкг/мл трипсина («Самсон-Мед», Россия). Образцы с сывороткой крови и вирусом выдерживали при температуре 37 °С в течение 1 ч, затем вносили к клеткам линии MARC-145, находящимся в состоянии 80–90% монослоя. Через 4–5 сут инкубации при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ проводили учет результатов с использованием микроскопии (Olympus, CKX31SF, Япония) для определения цитопатического действия (ЦПД) в клетках [11, 14]. При учете результатов использовали следующие контроли: контроль клеток – лунки с клетками, не инфицированными вирусом (с полным сохранением клеточного монослоя); контроль инфицирующей дозы – лунки с клетками, инфицированными рабочим титром вируса (с полной деградацией клеточного монослоя). Нейтрализующим титром сыворотки считали ее наибольшее разведение, при котором наблюдалась нейтрализация вируса с отсутствием ЦПД в культуре клеток [14].

⁴ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

Статистическая обработка данных.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета OriginPro 2023 (США). Для полученных данных в ИФА и реакции вирусной нейтрализации определяли среднее геометрическое значение обратных титров (СГТ) антител с указанием 95% доверительного интервала (95% ДИ).

Программа валидации включала исследование специфичности, повторяемости, промежуточной прецизионности. Регрессионный анализ калибровочной зависимости, расчет коэффициентов детерминации R^2 и статистический анализ данных проводили с использованием программы Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор экспериментальной модели животных и схемы иммунизации

При выборе модели животных и схемы иммунизации для оценки специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP наиболее значимыми параметрами являлись следующие: достоверное повышение титра специфических IgG-антител к белкам VP2/6 ротавируса типа А в сыворотках иммунизированных животных с последующим его нарастанием; достоверное повышение титра ВНА, при котором не регистрировали признаков ЦПД в культуре клеток в реакции нейтрализации.

Было проведено сравнение данных показателей на трех моделях животных, иммунизированных ротавирусной вакциной на основе VLP:

мыши, морские свинки и новорожденные карликовые свиньи (рис. 1–3). Выявлено, что однократная иммунизация не вызывает образования специфических IgG-антител и ВНА у карликовых свинок и морских свинок, однако приводит к значительной выработке IgG-антител у мышей – значение СГТ антител составило 128000.

После второй иммунизации наблюдалось статистически значимое повышение титра антител, а также были выявлены статистически значимые различия между группами животных. Двукратная иммунизация приводила к образованию специфических IgG-антител и ВНА у карликовых свинок (СГТ антител – 200,0 и 108,9 соответственно) и морских свинок (СГТ антител – 12800 и 2600 соответственно). У иммунизированных мышей наблюдался значительный рост уровня IgG-антител – значение СГТ антител составило 572440.

После третьей иммунизации наблюдался прирост специфических IgG-антител у всех трех видов модельных животных: у морских свинок уровень антител увеличился в 8 раз, у карликовых свинок – в 18,4 раза, у мышей – в 4,5 раза. Значения СГТ специфических IgG-антител составили: у мышей – 2457600, у морских свинок – 105733, у карликовых свинок – 3675,8. Эти данные коррелируют с результатами, полученными в реакции вирусной нейтрализации: уровень ВНА у морских свинок – 4800, у карликовых свинок – 485. Реакция вирусной нейтрализации у мышей не проводилась.

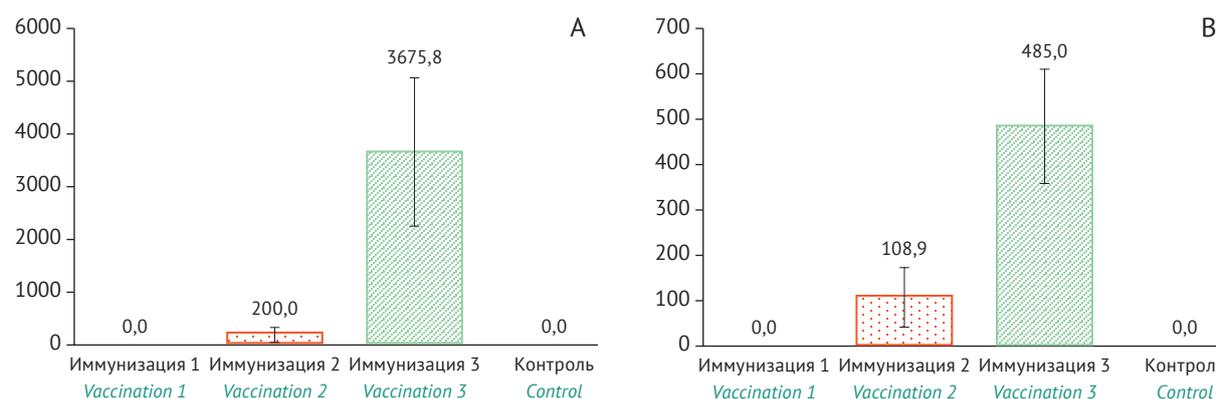


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Уровень специфических IgG-антител к белкам VP2/6 (А) и вируснейтрализующих антител (В) у новорожденных карликовых свинок после трехкратной иммунизации ротавирусной вакциной на основе вирусоподобных частиц (30 мкг/доза). Ось X – номер иммунизации, ось Y – среднее геометрическое значений обратных титров антител. Данные представлены с указанием значений доверительного интервала (95% доверительный интервал). Различия между группой иммунизированных животных (иммунизация 2 и 3) и контролем (введение физиологического раствора) статистически значимы ($p < 0,05$).

Fig. 1. Levels of anti-VP2 and anti-VP6 IgG antibodies (A) and neutralising antibodies (B) to rotavirus after three vaccinations of newborn minipigs with a rotavirus vaccine based on virus-like particles (30 µg/dose). The X-axis represents the vaccination number, and the Y-axis shows the geometric means of reciprocal antibody titres. The data are presented with 95% confidence intervals. The differences between the vaccinated group (vaccinations 2 and 3) and the control group (normal saline administration) are statistically significant ($p < 0.05$).

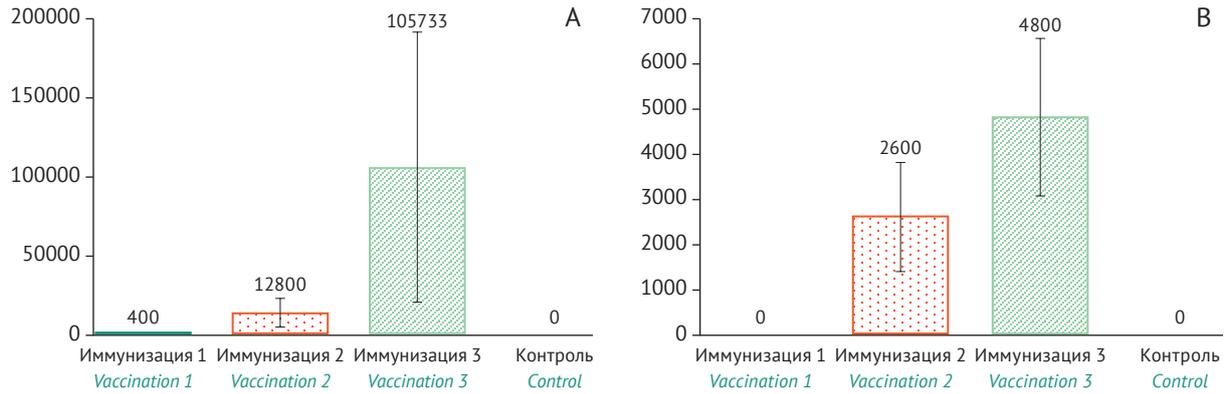


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Уровень специфических IgG-антител к белкам VP2/6 (А) и вируснейтрализующих антител (В) у морских свинок после трехкратной иммунизации ротавирусной вакциной на основе вирусоподобных частиц (30 мкг/доза). Ось X – номер иммунизации, ось Y – среднее геометрическое значений обратных титров антител. Данные представлены с указанием значений доверительного интервала (95% доверительный интервал). Различия между группой иммунизированных животных (иммунизация 2 и 3) и контролем (введение физиологического раствора) статистически значимы ($p < 0,05$).

Fig. 2. Levels of anti-VP2 and anti-VP6 IgG antibodies (A) and neutralising antibodies (B) to rotavirus after three vaccinations of guinea pigs with a rotavirus vaccine based on virus-like particles (30 µg/dose). The X-axis represents the vaccination number, and the Y-axis shows the geometric means of reciprocal antibody titres. The data are presented with 95% confidence intervals. The differences between the vaccinated group (vaccinations 2 and 3) and the control group (normal saline administration) are statistically significant ($p < 0.05$).

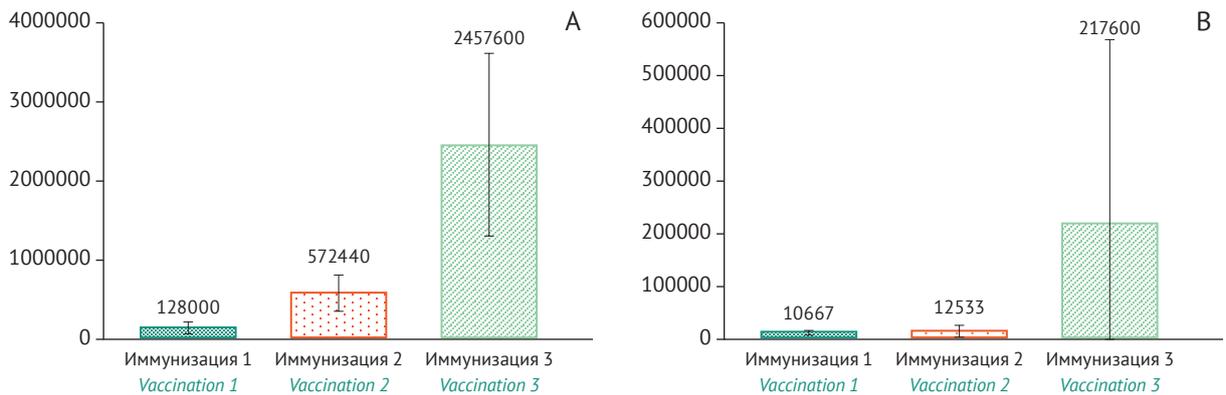


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Уровень специфических IgG-антител к белкам VP2/6 после трехкратной иммунизации мышей линии BALB/c ротавирусной вакциной на основе вирусоподобных частиц (30 мкг/доза) (А) и уровень IgG-антител в контрольной группе с введением физиологического раствора (В). Ось X – номер иммунизации, ось Y – среднее геометрическое значений обратных титров антител. Данные представлены с указанием значений доверительного интервала (95% доверительный интервал). Различия между группой иммунизированных животных и контролем (введение физиологического раствора) статистически значимы ($p < 0,05$).

Fig. 3. Levels of anti-VP2 and anti-VP6 IgG antibodies after three vaccinations of BALB/c mice with a rotavirus vaccine based on virus-like particles (30 µg/dose) (A) and levels of IgG antibodies in the control group receiving normal saline (B). The X-axis represents the vaccination number, and the Y-axis shows the geometric means of reciprocal antibody titres. The data are presented with 95% confidence intervals. The differences between the vaccinated group and the control group (normal saline) are statistically significant ($p < 0.05$).

Следует отметить, что у мышей в контрольной группе с введением физиологического раствора были зарегистрированы фоновые значения уровня антител (СГТ антител 10667) после первого введения, а также отмечался дальнейший рост значений (СГТ антител 12533 и 217600 для 2 и 3 иммунизации), чего не наблюдалось

в образцах сыворотки морских свинок и карликовых свиней. Полученные данные можно объяснить тем, что в организме мышей имеется определенный уровень гуморальной защиты в отношении ротавируса за счет уже сформированных собственных антител вне зависимости от вакцинации, вследствие чего их иммунная

система адаптирована для борьбы с этим вирусом [15]. Так как получение достоверных данных об эффекте исследуемой вакцины на мышах оказалось затруднительным, в связи с этим было принято решение об отказе от дальнейшего их использования в качестве модельных животных.

Результаты исследований показали, что карликовые свиньи являются подходящим модельным объектом для оценки специфической активности ротавирусных вакцин, однако это достаточно дорогостоящая модель для рутинных исследований. Применение морских свинок в качестве модельных животных обладает рядом преимуществ. В контрольной группе морских свинок с введением физиологического раствора не наблюдалось фоновых значений СГТ антител, в то время как в опытной группе животных, иммунизированных вакциной на основе VLP, выявлен выраженный иммунный ответ – при трехкратной внутримышечной иммунизации показано достижение высоких уровней специфических IgG-антител и ВНА. Сопоставление результатов ИФА и реакции нейтрализации, полученных после второй иммунизации, свидетельствует о формировании иммунного ответа на достаточном уровне, в связи с чем схема с двукратной иммунизацией представляется наиболее оптимальной для снижения нагрузки на иммунную систему при сохранении эффективности вакцинации.

Применение реакции нейтрализации как стандартной для определения уровня ВНА показало хорошие результаты в ходе исследования, однако данный метод является достаточно трудоемким и требует специальной подготовки персонала и оснащения помещений для обеспечения вирусной безопасности. Метод ИФА более простой в выполнении, при этом обладает высокой чувствительностью, что позволяет выявлять специфические антитела даже при их минимальной концентрации. Вследствие согласованности результатов методов ИФА и вирусной нейтрализации дальнейшие исследования по валидации метода определения специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP были проведены с использованием ИФА.

Валидация методики определения специфической активности

Валидация проводилась в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XV изд. ОФС.1.1.0012⁵ с целью экспериментального подтверждения

пригодности метода непрямого ИФА для определения антител, специфических к ротавирусу А, в сыворотках крови иммунизированных морских свинок. Программа валидации включала исследование специфичности, повторяемости, промежуточной прецизионности.

Специфичность. В ходе исследования оценивали способность методики ИФА однозначно определять антитела, специфичные к белкам VP2/6 ротавируса А. Для подтверждения специфичности методики были подготовлены следующие образцы: положительный контрольный образец (К+) – поликлональная гипериммунная сыворотка морской свинки в разведении 1:100 в ФСБТ-БСА; отрицательный контрольный образец (К-) – образцы сыворотки трех неиммунизированных морских свинок в разведениях от 1:100 до 1:12800 с шагом 2 в ФСБТ-БСА; модельные растворы № 1–3 – образцы гипериммунной сыворотки морской свинки в разведениях от 1:100 до 1:12800 с шагом 2 в ФСБТ-БСА; контроль реагентов (КР) – ФСБТ-БСА.

Критерии приемлемости:

- среднее значение оптической плотности ($ОП_{450}$) в образцах, содержащих КР, не должно превышать 0,1, что также подтверждает отсутствие влияния компонентов ФСБТ-БСА на результаты реакции;
- среднее значение $ОП_{450}$ в образце, содержащем К+, должно превышать 0,6;
- среднее значение $ОП_{450}$ в образцах, содержащих К-, не должно превышать 0,2;
- $ОП_{450}$ модельных растворов, содержащих антитела, специфичные к белкам VP2/6 ротавируса А, пропорциональна разведению модельных растворов.

Показано, что для полученных результатов соблюдены установленные критерии приемлемости (табл. 1).

Зависимость значений $ОП_{450}$ модельных растворов от количественного содержания специфических к ротавирусу А антител представлена на рисунке 4 (опубликован на сайте журнала⁶).

Таким образом, в ходе исследования специфичности методики показана способность предложенной тест-системы селективно выявлять IgG к VP2/6 ротавируса А. Определены критерии работоспособности предложенной методики, при которых полученные результаты соответствуют критериям приемлемости, в частности, среднее значение $ОП_{450}$ для образца К+ более 0,6; среднее значение $ОП_{450}$ для образцов

⁵ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1; 2023.

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-389-402-fig4>

Таблица 1. Результаты оценки специфичности методики иммуноферментного анализа
Table 1. Specificity validation results for the enzyme-linked immunosorbent assay

Наименование образца <i>Sample name</i>	Значения оптической плотности (ОП ₄₅₀) при разведениях <i>Absorbance (A₄₅₀) for the following dilutions</i>							
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
Сыворотка крови неиммунизированного животного № 1, К- <i>Serum of non-vaccinated animal 1, K-</i>	0,136	0,105	0,079	0,068	0,055	0,048	0,046	0,046
Сыворотка крови неиммунизированного животного № 2, К- <i>Serum of non-vaccinated animal 2, K-</i>	0,129	0,101	0,074	0,066	0,053	0,049	0,046	0,045
Сыворотка крови неиммунизированного животного № 3, К- <i>Serum of non-vaccinated animal 3, K-</i>	0,135	0,106	0,077	0,065	0,055	0,048	0,046	0,046
Стандартное отклонение, SD <i>Standard deviation, SD</i>	0,004	0,003	0,003	0,002	0,001	0,001	0,000	0,001
Среднее значение К- в каждом разведении <i>Mean K- for each dilution</i>	0,133	0,104	0,077	0,066	0,054	0,048	0,046	0,046
Среднее значение К- <i>Mean K-</i>	0,072							
Коэффициент вариации, CV (%) <i>Coefficient of variation, CV (%)</i>	2,8	2,5	3,3	2,3	2,1	1,2	0	1,3
Модельный раствор № 1 <i>Model solution 1</i>	0,643	0,539	0,480	0,462	0,407	0,392	0,302	0,243
Модельный раствор № 2 <i>Model solution 2</i>	0,618	0,546	0,506	0,470	0,396	0,396	0,294	0,246
Модельный раствор № 3 <i>Model solution 3</i>	0,684	0,627	0,534	0,508	0,427	0,349	0,333	0,267
Поликлональная гипериммунная сыворотка морской свинки (1:100), К+ <i>Polyclonal hyperimmune guinea pig serum (1:100), K+</i>	0,697	0,695	-	-	-	-	-	-
Контроль реагентов <i>Reagent control</i>	0,049	0,046	-	-	-	-	-	-

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

Примечание. К-, отрицательный контрольный образец; К+, положительный контрольный образец; «-» – не применимо.
Note. K-, negative control sample; K+, positive control sample; -, not applicable.

К- менее 0,2; значение ОП₄₅₀ контроля реагентов менее 0,1. Таким образом, методика непрямого ИФА обеспечивает высокую селективность определения специфических IgG-антител к ротавирусу А в образцах сыворотки крови морских свинок, иммунизированных вакциной.

Повторяемость. В ходе исследования оценивали степень близости друг к другу результатов измерений, получаемых в пределах короткого промежутка времени, при использовании одних и тех же реактивов и одного и того же оборудования. Для оценки повторяемости в качестве образцов были использованы образцы сыворотки крови морских свинок, иммунизированных ротавирусной вакциной на основе VLP (30 мкг/доза), и сыворотки контрольных (неиммунизированных) морских свинок. Был произведен расчет среднего значения обрат-

ной величины титра IgG к VP 2/6 ротавируса А, стандартного отклонения (SD) и коэффициента вариации (CV, %).

Критерий приемлемости. Коэффициент вариации результатов, полученных в условиях повторяемости, не должен быть более 15%.

Показано, что результаты оценки повторяемости соответствуют критериям приемлемости (табл. 2). Значения CV для вакцины серии 01 (12,4%), и для серии 02 (7,7%) не превышали 15%, что свидетельствует о повторяемости методики.

Промежуточная прецизионность. В ходе исследования оценивали степень близости друг к другу результатов измерений, получаемых разными сотрудниками в разные дни при использовании одних и тех же реактивов и одного и того же оборудования. Для оценки

Таблица 2. Результаты оценки повторяемости методики иммуноферментного анализа
Table 2. Repeatability validation results for the enzyme-linked immunosorbent assay

№ серии вакцины <i>Vaccine batch No.</i>	Обратная величина титра IgG к VP2/6 ротавируса А (индивидуальные и средние значения в измерениях) <i>Reciprocal titres of IgGs to rotavirus A VP2 and VP6 (individual and mean values)</i>								Среднее значение <i>Mean</i>	SD	CV, %
	Измерение 1 <i>Measurement 1</i>	Измерение 2 <i>Measurement 2</i>	Измерение 3 <i>Measurement 3</i>	Измерение 4 <i>Measurement 4</i>	Измерение 1	Измерение 2	Измерение 3	Измерение 4			
01	25600	22400	25600	28800	25600	25600	25600	22400	24800	3063,8	12,4
	12800		12800		25600		12800				
	25600		51200		25600		25600				
	25600		25600		25600		25600				
02	25600	25600	25600	22400	25600	25600	25600	22400	24000	1847,5	7,7
	25600		12800		25600		12800				
	25600		25600		25600		25600				
	25600		25600		25600		25600				

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

Примечание. SD – стандартное отклонение; CV – коэффициент вариации.

Note. IgG, immunoglobulin G; VP, virus protein; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

Таблица 3. Результаты оценки повторяемости методики иммуноферментного анализа в условиях промежуточной прецизионности

Table 3. Intermediate precision validation results for the enzyme-linked immunosorbent assay

№ серии вакцины <i>Vaccine batch No.</i>	Обратная величина титра IgG к VP2/6 ротавируса А (индивидуальные и средние значения в измерениях) <i>Reciprocal titres of IgGs to rotavirus A VP2 and VP6 (individual and mean values)</i>								Среднее значение <i>Mean</i>	SD	CV, %
	Измерение 1 <i>Measurement 1</i>	Измерение 2 <i>Measurement 2</i>	Измерение 3 <i>Measurement 3</i>	Измерение 4 <i>Measurement 4</i>	Измерение 1	Измерение 2	Измерение 3	Измерение 4			
01	25600	25600	25600	22400	25600	22400	25600	22400	23200	1600	6,9
	25600		12800		12800		12800				
	25600		25600		25600		25600				
	25600		25600		25600		25600				
02	25600	25600	25600	22400	25600	25600	25600	28800	25600	1600	10,2
	25600		12800		25600		12800				
	25600		25600		25600		51200				
	25600		25600		25600		25600				

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

Примечание. SD – стандартное отклонение; CV – коэффициент вариации.

Note. IgG, immunoglobulin G; VP, virus protein; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

промежуточной прецизионности анализ тех же образцов сывороток морских свинок, что и при оценке повторяемости, проводили на следующий день.

Критерий приемлемости. Сравнивали результаты оценки повторяемости и промежуточной прецизионности. Достоверность результатов ($P=95\%$) определяли по t -критерию Стьюдента. Рассчитанное значение критерия Стьюдента (t_{pac}) должно быть меньше табличного ($t_{табл}=2,45$ при $f=6$).

Показано, что результаты оценки промежуточной прецизионности соответствуют критериям приемлемости (табл. 3). Значения CV для вакцины серии 01 (6,9%) и серии 02 (10,2%) не превышали 15%, что подтверждает внутрилабораторную прецизионность методики. Рассчитанное значение критерия Стьюдента ($t_{pac}=0$) меньше табличного значения ($t_{табл}=2,45$), что свидетельствует об отсутствии существенных различий в результатах измерений, полученных при исследовании повторяемости и промежуточной прецизионности.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка специфической активности вакцин проводится в том числе по степени активации гуморального иммунного ответа у иммунизированных животных, используемых в качестве экспериментальной модели. Учитывая сложность и специфику иммунобиологических лекарственных препаратов, выбор подходящей модели животных для исследований крайне важен.

Способ и кратность введения вакцины также играют существенную роль при проведении исследований, так как от этого зависит выраженность иммунного ответа. Эти параметры должны быть аналогичны используемому в клинической практике. Внутримышечное введение вакцины является предпочтительным из-за оптимальных показателей всасывания, иммуногенности, скорости формирования поствакцинального иммунитета и требуемой точности вводимой дозы. Кроме того, этот путь введения соответствует способу, наиболее часто используемому в клинической практике.

Для ротавирусных вакцин в настоящее время отсутствует определенная модель для оценки эффективности вакцин, что является существенной проблемой [16]. Для изучения формирования иммунитета против РВИ используются разные модели животных (мыши, крысы, кролики, свиньи и др.)⁷. Каждая из этих моделей имеет свои преимущества и недостатки, включая восприимчивость к инфекции, влияние микробиоты на проявление РВИ и др. Наиболее часто применяются модели мышей и свиней [16]. В данной работе были рассмотрены три модели животных: мыши, морские свинки и карликовые свиньи.

Использование мышей в качестве модельных животных имеет ряд преимуществ. Мыши являются наиболее изученными животными, в том числе для исследования инфекций, включая ротавирус. Применение мышей экономически целесообразно при проведении экспериментов, так как они имеют относительно короткий срок жизни и быстро размножаются. Мыши, как и человек, восприимчивы к РВИ, что позволяет изучать развитие инфекции и эффективность вакцин на этих животных. Кроме того, в организме мышей регистрируется высокий уровень антител против ротавируса, что позволяет исследовать иммунные механизмы защиты от РВИ. На результат исследований при использовании этой модели влияет выбор линии мышей. Уровень иммунной защиты, сформированный у инбредных мышей, как правило, выше, чем

у беспородных мышей. В экспериментах чаще всего используются мыши линии BALB/c [17].

Применение морских свинок в качестве модельных животных широко распространено из-за их восприимчивости к РВИ и высокого уровня выработки антител против вируса. Чувствительность морских свинок к ротавирусу подтверждается серологическими данными. Кроме того, важное значение имеет доступность и экономичность этой модели.

Использование в качестве модели новорожденных карликовых свинок обусловлено подверженностью данных животных инфекции, вызванной ротавирусом человека. Этот вид животных является универсальной моделью для оценки качества ротавирусных вакцин, что объясняется значительным сходством физиологии, анатомических особенностей и механизмов формирования системного и местного иммунитета у человека и свиньи, а также возможностью воспроизведения клинических проявлений заболевания [12]. Результаты исследований по сравнению эффективности ротавирусных вакцин при заражении ротавирусом свинок показали, что применение данной модели позволяет проводить более объективную оценку потенциала вакцины в сопоставлении с моделью мышей [18]. Недостатком мышей в качестве модели является то, что они подвержены ротавирусной диарее только в возрасте до 2–3 нед. Это усложняет изучение формирования иммунного ответа к РВИ у мышей. В то же время поросята чувствительны к заражению ротавирусом по меньшей мере до возраста 8 нед., что достаточно для изучения поствакцинального иммунитета [12, 19, 20].

В ходе данного исследования было продемонстрировано формирование выраженного иммунного ответа при вакцинации ротавирусной вакциной на основе VLP на модели морских свинок, а также отсутствие фоновых значений СГТ антител в контрольной группе у морских свинок с введением физиологического раствора. Полученные результаты свидетельствуют о релевантности модели морских свинок в рамках нашего исследования.

Выбор вирусного антигена имеет важное значение при изучении антигенных и иммуногенных свойств ротавирусных вакцин. Белок ротавируса VP6 обладает как антигенными, так и иммуногенными свойствами и способен инициировать выработку специфических IgG и IgA слизистой оболочки [21]. Благодаря своей высокой иммуногенности, консервативным характеристикам

⁷ Морозова ОВ. Генотиповое разнообразие и филодинамика циркулирующих на территории России ротавирусов, сравнение с вакцинными штаммами: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.; 2021.

белок VP6 рассматривается как основа для разработки кандидатных нереплицирующихся вакцин против РВИ, способный индуцировать гетерологичный перекрестный защитный иммунитет к РВИ на животных моделях [22, 23]. Ранее была продемонстрирована способность белка VP6 формировать устойчивый, длительный и специфический IgG-опосредованный иммунный ответ против различных штаммов ротавируса типа А.

При оценке специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP при помощи ИФА для увеличения чувствительности метода была использована комбинация рекомбинантных белков VP2/6. Была показана взаимосвязь между титрами специфических IgG-антител и ВНА после иммунизации животных. Валидация разработанной методики ИФА для определения специфической активности ротавирусной вакцины на основе VLP на модели морских свинок показала ее специфичность, повторяемость и промежуточную прецизионность при соблюдении критериев приемлемости.

ВЫВОДЫ

1. Разработан подход для оценки специфической активности ротавирусной вакцины на осно-

ве вирусоподобных частиц для определения титра специфических IgG-антител к белкам VP2/6 ротавируса А в образцах сыворотки крови иммунизированных животных с использованием двух методов – иммуноферментного анализа и реакции нейтрализации.

2. Установлено, что для изучения иммунного ответа после иммунизации ротавирусной вакциной оптимальной моделью являются морские свинки. Двукратная схема иммунизации вакциной в дозе 30 мкг/доза достаточна для обеспечения выраженного поствакцинального иммунитета.
3. В ходе валидационных испытаний установлено, что методика ИФА для определения титра специфических иммуноглобулинов класса G к VP2/6 ротавируса А в образцах сыворотки крови вакцинированных морских свинок удовлетворяет критериям приемлемости по таким характеристикам, как специфичность, повторяемость и промежуточная прецизионность, что обеспечивает получение достоверных результатов анализа.
4. Метод ИФА может быть использован для контроля показателя качества «Специфическая активность» ротавирусной вакцины на основе вирусоподобных частиц.

Литература/References

1. Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: Knipe DN, Howley PM, Griffin DE, eds. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. P. 1747–86.
2. Hallowell BD, Chavers T, Parashar U, Tate JE. Global estimates of rotavirus hospitalizations among children below 5 years in 2019 and current and projected impacts of rotavirus vaccination. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2022;11(4):149–58. <https://doi.org/10.1093/jpids/piab114>
3. Troeger C, Khalil IA, Rao PC, Cao S, Blacker BF, Ahmed T, et al. Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhea among children younger than 5 years. *JAMA Pediatr*. 2018;172(10):958–65. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2018.1960>
4. Yen C, Healy K, Tate JE, Parashar UD, Bines J, Neuzil K, et al. Rotavirus vaccination and intussusception – science, surveillance, and safety: a review of evidence and recommendations for future research priorities in low- and middle-income countries. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(10):2580–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1197452>
5. Черепушкин СА, Цибезов ВВ, Южаков АГ, Латышев ОЕ, Алексеев КП, Алтаева ЕГ и др. Синтез и характеристика вирусоподобных частиц ротавируса А (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) человека. *Вопросы вирусологии*. 2021;66(1):55–64. Cherepushkin SA, Tsibezov VV, Yuzhakov AG, Latyshev OE, Alekseev KP, Altayeva EG, et al. Synthesis and characterization of human rotavirus A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) virus-like particles. *Problems of Virology*. 2021;66(1):55–64 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0507-4088-27>
6. Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(11):787–96. <https://doi.org/10.1038/nri2868>
7. Li C, Luo G, Zeng Y, Song F, Yang H, Zhang S, et al. Establishment of sandwich ELISA for quality control in rotavirus vaccine production. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(2):243. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020243>
8. Gupta R, Arora K, Singha Roy S, Joseph A, Rastogi R, Mehrotra Arora N. Platforms, advances, and technical challenges in virus-like particles-based vaccines. *Front Immunol*. 2023;14:1123805. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1123805>
9. Яговкин ЭА, Онищенко ГГ, Попова АЮ, Ежлова ЕБ, Мельникова АА, Соловьев МЮ и др. Состояние и перспективы разработки вакцин для специфической профилактики этеровирусной (неполио) инфекции. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(4):74–82. Yagovkin EA, Onishchenko GG, Popova AYU, Ezhlova EB, Melnikova AA, Soloviev MYU, et al. Condition and prospects of development of vaccines for specific prevention of enterovirus (nonpolio) infection. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(4):74–82 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-4-74-82>
10. Воробьева МС, Афонина ОС, Бархалева ОА, Щербинина МС, Саркисян КА, Рукавишников АВ и др. Анализ многолетнего изучения инактивированных культуральных вакцин для профилактики клещевого энцефалита отечественного и зарубежного производства по показателю качества – специфическая активность (иммуногенность). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;(4):4–10. Vorobieva MS, Afonina OS, Barhaleva OA, Shcherbinina MS,

- Sarkisyan KA, Rukavishnikov AV, et al. The analysis of a long-term experience of studying inactivated cell-culture vaccines for preventing tick-borne encephalitis of domestic and foreign manufacture in terms of specific activity (immunogenicity). *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2015;(4):4–10 (In Russ.). EDN: [VAEGZN](https://doi.org/10.36233/0507-4088-169)
11. Филатов ИЕ, Цибезов ВВ, Баландина МВ, Норкина СН, Латышев ОЕ, Елисеева ОВ и др. Использование вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных вирусных белков VP2/VP6 ротавируса А для оценки гуморального иммунного ответа методом ИФА. *Вопросы вирусологии*. 2023;68(2):161–71. Filatov IE, Tsibezov VV, Balandina MV, Norkina SN, Latyshev OE, Eliseeva OV, et al. Virus-like particles based on rotavirus A recombinant VP2/VP6 proteins for assessment the antibody immune response by ELISA. *Problems of Virology*. 2023;68(2):161–171 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0507-4088-169>
 12. Хаметова КМ, Алексеев КП, Южаков АГ, Костина ЛВ, Раев СА, Мусиенко МИ и др. Молекулярно-биологические свойства клонированного штамма Wa ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии*. 2019;64(1):16–22. Khametova KM, Alekseev KP, Yuzhakov AG, Kostina LV, Raev SA, Musienko MI, et al. Evaluation of the molecular-biological properties of human rotavirus A strain Wa. *Problems of Virology*. 2019;64(1):16–22 (In Russ.). <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-16-22>
 13. Sullivan EJ, Rosenbaum MJ. Methods for preparing tissue culture in disposable microplates and their use in virology. *Am J Epidemiol*. 1967;85(3):424–37.
 14. Костина ЛВ, Филатов ИЕ, Елисеева ОВ, Латышев ОЕ, Чернорыж ЯЮ, Юрлов КИ и др. Исследование безопасности и иммуногенности вакцины на основе VLP для профилактики ротавирусной инфекции на модели новорожденных карликовых свиней. *Вопросы вирусологии*. 2023;68(5):415–28. Kostina LV, Filatov IE, Eliseeva OV, Latyshev OE, Chernoryzh YaYu, Yurlov KI, et al. Study of the safety and immunogenicity of VLP-based vaccine for the prevention of rotavirus infection in neonatal minipig model. *Problems of Virology*. 2023;68(5):415–28 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0507-4088-194>
 15. Ward RL, McNeal MM, Sheridan JF. Evidence that active protection following oral immunization of mice with live rotavirus is not dependent on neutralizing antibody. *Virology*. 1992;188(1):57–66. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90734-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90734-7)
 16. McAdams D, Estrada M, Holland D, Singh J, Sawant N, Hickey JM, et al. Concordance of *in vitro* and *in vivo* measures of non-replicating rotavirus vaccine potency. *Vaccine*. 2022;40(34):5069–78. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.017>
 17. Choi AH, McNeal MM, Basu M, Flint JA, Stone SC, Clements JD et al. Intranasal or oral immunization of inbred and outbred mice with murine or human rotavirus VP6 proteins protects against viral shedding after challenge with murine rotaviruses. *Vaccine*. 2002;20(27–28):3310–21. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00315-8](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00315-8)
 18. El-Attar L, Oliver SL, Mackie A, Charpilienne A, Poncet D, Cohen J, Bridger JC. Comparison of the efficacy of rotavirus VLP vaccines to a live homologous rotavirus vaccine in a pig model of rotavirus disease. *Vaccine*. 2009;27(24):3201–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.043>
 19. Franco MA, Greenberg HB. Immunity to rotavirus infection in mice. *J Infect Dis*. 1999;179(Suppl. 3):466–9. <https://doi.org/10.1086/314805>
 20. Azevedo MP, Vlasova AN, Saif LJ. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(2):169–81. <https://doi.org/10.1586/erv.13.3>
 21. Niu X, Liu Q, Wang P, Zhang G, Jiang L, Zhang S, et al. Establishment of an indirect ELISA method for the detection of the bovine rotavirus VP6 protein. *Animals (Basel)*. 2024;14(2):271. <https://doi.org/10.3390/ani14020271>
 22. Afchangi A, Jalilvand S, Mohajel N, Marashi SM, Shoja Z. Rotavirus VP6 as a potential vaccine candidate. *Rev Med Virol*. 2019;29(2):e2027. <https://doi.org/10.1002/rmv.2027>
 23. Shoja Z, Jalilvand S, Latifi T, Roohvand F. Rotavirus VP6: involvement in immunogenicity, adjuvant activity, and use as a vector for heterologous peptides, drug delivery, and production of nano-biomaterials. *Arch Virol*. 2022;167(4):1013–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05407-9>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.Е. Филатов** – проведение экспериментальных исследований, написание текста рукописи; **М.М. Силаenkova** – проведение экспериментальных исследований, написание и редактирование текста рукописи; **В.В. Цибезов** – проведение экспериментальных исследований, редактирование текста рукописи; **М.В. Баландина, С.Н. Норкина, О.Е. Латышев, О.В. Елисеева, С.А. Черепушкин** – сбор и анализ результатов исследований, редактирование текста рукописи; **Т.В. Гребенникова** – формулирование выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования с использованием экспериментальных животных был одобрен биоэтической комиссией АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (№ БЭК 1.42/22 от 21.09.2022) и локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (№ 05/2022 от 06.10.2022).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **I.E. Filatov** conducted the experiments and drafted the manuscript. **M.M. Silaenkova** conducted the experiments, drafted and edited the manuscript. **V.V. Tsibezov** conducted the experiments and edited the manuscript. **M.V. Balandina, S.N. Norkina, O.E. Latyshev, O.V. Eliseeva,** and **S.A. Cherepushkin** collected and analysed the results and edited the manuscript. **T.V. Grebennikova** formulated the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The research was approved by the Bioethics Committee of the research-and-manufacturing company 'HOME OF PHARMACY' (Approval No. BEC 1.42/22 dated 21 September 2022) and the Local Biomedical Ethics Committee of the Federal State Budgetary Institution 'National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya' of the Ministry of Health of the Russian Federation (Approval No. 05/2022 dated 6 October 2022).

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещен рисунок 4.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-389-402-fig4>

Additional information. *Figure 4* is published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-389-402-fig4>

Об авторах / Authors

Филатов Илья Евгеньевич / Ilya E. Filatov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5274-224X>

Силаенкова Мария Михайловна / Maria M. Silaenkova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-1545-3969>

Цибезов Валерий Владимирович, канд. биол. наук / **Valeriy V. Tsibezov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2150-5764>

Баландина Марина Владимировна, канд. биол. наук / **Marina V. Balandina**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-8179-1379>

Норкина Светлана Николаевна, канд. биол. наук / **Svetlana N. Norkina**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-9608-4713>

Латышев Олег Евгеньевич, канд. биол. наук / **Oleg E. Latyshev**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Елисеева Олеся Васильевна, канд. биол. наук / **Olesja V. Eliseeva**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

Черепушкин Станислав Андреевич / Stanislav A. Cherepushkin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1734-5369>

Гребенникова Татьяна Владимировна, д-р биол. наук, проф., член-корр. РАН / **Tatyana V. Grebennikova**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Поступила 04.06.2024

После доработки 28.10.2024

Принята к публикации 06.12.2024

Received 4 June 2024

Revised 28 October 2024

Accepted 6 December 2024



Анализ иммуногенной активности композиции инактивированных штаммов ротавируса вида А при иммунизации мышей

М.В. Коврижко , Е.П. Колпакова, Д.С. Колпаков, Т.И. Твердохлебова, Е.С. Курбатов

Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Газетный пер., д. 119, г. Ростов-на-Дону, 344000, Российская Федерация

✉ Коврижко Марина Владимировна; npo-kovrizhko@yandex.ru; rostovniimp@rniimp.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Для профилактики ротавирусной инфекции применяются живые аттенуированные вакцины. Однако, учитывая мировую и российскую практику вакцинации, а также особенности физиологии детского организма, актуальным представляется создание инактивированных ротавирусных вакцин. Необходимым условием при разработке таких вакцин является наличие стабильно реплицирующихся штаммов вируса и подбор оптимального режима инактивации для проявления необходимого уровня антигенной активности и иммуногенности.

ЦЕЛЬ. Оценка и сравнительная характеристика специфического противоротавирусного иммунного ответа на введение инактивированных (нативных) штаммов и композиции инактивированных штаммов ротавируса вида А на модели мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе использовали штаммы ротавируса человека вида А (RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7), стандартизированный штамм SA-11 № 2364 ГКВ, клеточные культуры линий Vero и СПЭВ. Инфекционную активность штаммов, выращенных на перевиваемых клетках линии Vero, определяли методом титрования вируса. Учет зараженных клеточных культур вели до наступления цитопатического действия и рассчитывали показатель ТЦД₅₀ (50% тканевая цитопатическая доза) по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали его в lg ТЦД₅₀/мл. Для инактивации штаммов вируса использовали формальдегид. Для оценки иммуногенной активности проводили иммунизацию нелинейных белых мышей с использованием нативных штаммов и композиции инактивированных штаммов (RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7). После иммунизации у животных отбирали кровь и в образцах сыворотки определяли титр антител к ротавирусу вида А с помощью метода гетерогенного непрямого иммуноферментного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Штаммы ротавируса, адаптированные к росту на клеточной культуре линии Vero, проявляли инфекционную активность с уровнем титров от 8,9 до 7,9 lg ТЦД₅₀/мл. Показано, что инактивация штаммов наступала при температуре 37 °С и концентрации формальдегида от 0,05 до 0,025% в зависимости от длительности обработки. При оценке антигенной активности выявлено, что титр антигена в композиции инактивированных штаммов (1:16) был ниже, чем в случае нативных штаммов (1:32–1:64). Показано, что нативные штаммы и композиция инактивированных штаммов при иммунизации мышей обладали сравнимой специфической иммуногенной активностью.

ВЫВОДЫ. Получены штаммы-кандидаты ротавируса вида А, стабильно реплицирующиеся на перевиваемых клетках линии Vero. Подобраны оптимальные условия инактивации штаммов и разработана композиция инактивированных штаммов, обладающая специфической антигенной активностью и иммуногенностью. Представленные данные

позволяют рассматривать полученную композицию инактивированных штаммов ротавируса вида А как основу для дальнейшей разработки инактивированной ротавирусной вакцины.

Ключевые слова: ротавирус вида А; ротавирусная инфекция; вакцинация; инактивированные ротавирусные вакцины; композиция инактивированных штаммов; иммуногенная активность; инфекционная активность; антигенная активность; антитела к ротавирусу вида А

Для цитирования: Коврижко М.В., Колпакова Е.П., Колпаков Д.С., Твердохлебова Т.И., Курбатов Е.С. Анализ иммуногенной активности композиции инактивированных штаммов ротавируса вида А при иммунизации мышей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2024;24(4):403–414. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-403-414>

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР № 121032300240-8.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Immunogenicity analysis of a composition of inactivated human rotavirus A strains in mice following immunisation

Marina V. Kovrizhko ✉, Elena P. Kolpakova, Dmitry S. Kolpakov,
Tatiana I. Tverdokhlebova, Egor S. Kurbatov

Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, 119 Gazetny Ln., Rostov-on-Don
344000, Russian Federation

✉ Marina V. Kovrizhko; npo-kovrizhko@yandex.ru; rostovniimp@rniimp.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Currently, rotavirus infection is prevented with live attenuated vaccines. However, international and Russian vaccination practices, as well as the physiological characteristics of paediatric patients, necessitate the development of inactivated rotavirus vaccines. Prerequisites for the development of such vaccines are the availability of virus strains capable of stable replication and the selection of optimal inactivation conditions providing for the required antigenicity and immunogenicity levels.

AIM. This study aimed to evaluate and compare the characteristics of the rotavirus-specific immune response to native strains and to a composition of inactivated rotavirus A strains in a mouse model.

MATERIALS AND METHODS. The study used human rotavirus A strains (RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7), a standard rotavirus strain (SA-11 NVC 2364, National Virus Collection of the Russian Federation), and cultures of pig embryo kidney cells treated with Versene solution (SPEV) and Vero cells. Virus titration was used to determine the infectivity of the strains grown in Vero cells maintained in continuous culture. The authors monitored infected cell cultures up to the onset of the cytopathic effect, calculated the 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) by the Kärber method modified by Ashmarin, and expressed the results as log₁₀ TCID₅₀/mL. Virus strains were inactivated with formaldehyde. To evaluate immunogenicity, outbred white mice were immunised with native strains and the composition of inactivated strains (RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7). After immunisation, blood was taken from the animals, and the serum titre of rotavirus A antibodies was determined by indirect heterogeneous enzyme immunoassay.

RESULTS. The infectivity of the rotavirus strains adapted to Vero cells ranged from 8.9 to 7.9 log₁₀ TCID₅₀/mL. When selecting inactivation conditions, the authors showed that inactivation occurred at a temperature of 37 °C and a formaldehyde concentration of 0.05–0.025% (depending on the duration of treatment). The antigenicity analysis demonstrated that the

antigen titre of the inactivated strain composition (1:16) was lower than that of native strains (1:32–1:64). The authors demonstrated comparability of immunogenicity profiles of the inactivated strain composition and native strains in mice.

CONCLUSIONS. The study generated candidate rotavirus A strains that exhibited stable replication in continuous cultures of Vero cells. The authors selected optimal inactivation conditions for these rotavirus strains and developed an inactivated strain composition showing antigenicity and immunogenicity. The presented data suggest that the composition of inactivated rotavirus A strains can be considered as a basis for further development of an inactivated rotavirus vaccine.

Keywords: rotavirus A; rotavirus infection; vaccination; inactivated rotavirus vaccines; composition of inactivated strains; immunogenicity; infectivity; antigenicity; anti-rotavirus A antibodies

For citation: Kovrizhko M.V., Kolpakova E.P., Kolpakov D.S., Tverdokhlebova T.I., Kurbatov E.S. Immunogenicity analysis of a composition of inactivated human rotavirus A strains in mice following immunisation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):403–414. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-403-414>

Funding. This study was conducted as part of R&D project No. 121032300240-8.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Ротавирусная инфекция является ведущей причиной тяжелых гастроэнтеритов, особенно у детей до 5 лет¹. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует включение ротавирусных вакцин в программы для иммунизации детей². В странах, где ротавирусные вакцины давно включены в национальный календарь прививок, наблюдается эффект формирования популяционного иммунитета [1, 2].

Ротавирусы вида А обладают выраженным серотиповым и генотипическим разнообразием. Геном ротавирусов сегментирован, и гены, кодирующие белки вируса VP4 (Р-белок) и VP7 (G-белок), могут независимо сегрегировать с образованием большого числа сочетаний этих белков [3]. По данным литературных источников, в настоящее время в мире, в том числе и в Российской Федерации, широкое распространение получили шесть комбинаций: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8] [4–7].

В настоящее время для профилактики ротавирусной инфекции применяются живые аттенуированные вакцины. Однако, учитывая мировую и отечественную практику вакцинации [8–10], а также принимая во внимание особенности физиологии детского организма, актуальным представляется разработка альтернативных подходов для вакцинации и создание нереплицирующихся ротавирусных вакцин [7, 11], что будет являться необходимым дополнением к существующим живым вакцинам. По мнению

авторов, нереплицирующиеся ротавирусные вакцины оптимальны для первоначального введения в организм ребенка с несовершенной пищеварительной системой и несформированным иммунитетом. Немаловажным аспектом является то, что использование этих вакцин не приводит к возникновению такого специфического нежелательного явления, как инвагинация кишечника (у детей группы риска). Кроме того, при применении вышеуказанных вакцин отсутствуют риски реассортации генов дикого и вакцинного штаммов в кишечнике иммунизированного ребенка, что сопряжено с опасностью возникновения эпидемического геноварианта штамма. Важно отметить, что цельновирионные инактивированные вакцины содержат стабилизированные антигены VP4, VP7, VP6 и стимулируют у человека полноценный иммунный ответ [11, 12]. Нереплицирующиеся ротавирусные вакцины имеют ряд дополнительных преимуществ перед живыми вакцинами: возможность одновременного введения препарата с другими вакцинами, входящими в национальный календарь прививок, безопасность для детей из группы риска, экономическая эффективность [10, 11].

В настоящее время разрабатывается ряд новых видов инактивированных (нереплицирующихся) вакцин [7, 10, 11, 13]. Некоторые из этих вакцин успешно прошли доклинические исследования и показали перспективные результаты по защитной эффективности на экспериментальных животных [11, 13] и в настоящее время

¹ <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/342905/WER9628-301-319-eng-fre.pdf?sequence=1>

² Там же.

находятся на этапе клинических исследований [14, 15].

Следует отметить, что создание ротавирусной вакцины невозможно без наличия адаптированных к перевиваемым культурам клеток штаммов ротавируса человека. При разработке вакцинных препаратов используют линии клеток, рекомендуемые ВОЗ и разрешенные к применению в производстве³. Наиболее часто для производства вирусных вакцин используется культура клеток Vero, что связано с их высокой чувствительностью ко многим видам вирусов человека⁴ [16–19].

При создании полного цикла производства иммунобиологических препаратов неотъемлемой частью является разработка показателей качества вакцины⁵. Показатель «Подлинность» – один из важнейших при оценке качества вакцинного препарата. Поскольку технология производства ротавирусной вакцины включает в себя процесс инактивации штаммов-кандидатов, критической точкой данного этапа является контроль на специфическую антигенную активность композиции инактивированных штаммов, входящих в состав вакцинного препарата.

Цель работы – оценка и сравнительная характеристика специфического противоротавирусного иммунного ответа на введение неинактивированных (нативных) штаммов и композиции инактивированных штаммов ротавируса вида А на модели мышей.

В задачи исследования входили адаптация кандидатных штаммов ротавируса вида А к росту в культуре клеток линии Vero и их культивирование, определение инфекционной активности штаммов вируса, подбор метода их инактивации и отработка схемы иммунизации лабораторных животных для изучения иммуногенных свойств культуральных инактивированных штаммов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы вирусов, линии клеток

В работе использовали штаммы-кандидаты ротавируса вида А (RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7), полученные из рабочей коллекции вирусов ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии»

Роспотребнадзора (ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора). Кандидатные штаммы размножали в культуре клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ в поддерживающей среде DMEM с глутамином (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением антибиотиков (пенициллин 100 ЕД/мл, стрептомицин 100 мкг/мл) и 5% эмбриональной телячьей сыворотки – ЭТС (ООО «БиолоТ», Россия) при температуре 37 °С и 5% CO₂. Цитопатическое действие (ЦПД) вирусов развивалось на 3–8 сут в зависимости от дозы заражения.

Штаммы-кандидаты были собраны от разных детей, больных ротавирусным гастроэнтеритом, в различные эпидемические периоды. Генотипы ротавирусных изолятов: RRV-4 G3[P8]; RRV-5G4[P8]; RRV-6 G9[P8], RRV-7 G4[P8].

Использовали стандартизированный штамм ротавируса вида А SA-11 № 2364 ГКВ, находящийся в коллекции вирусов ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора и задепонированный в Государственной коллекции вирусов (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Штамм SA-11 № 2364 ГКВ размножали в перевиваемых клетках линии СПЭВ: полная дегенерация монослоя – через 48–84 ч с концентрацией вирусных частиц не менее 10⁷–10⁸ в 1 мл культуральной жидкости; уровень титра антигена (определен с помощью иммуноферментного анализа) – не ниже 1:64.

Клетки линии Vero получены из главного банка культур клеток ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора. Клетки данной линии на всех пассажах контролировали согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) на стерильность, жизнеспособность, морфологическую однородность, присутствие посторонних агентов⁶. Подсчет клеток осуществляли в гемоцитометре по общепринятой методике [17, 20].

В работе использовали вакцину для профилактики ротавирусной инфекции, пентавалентную, живую (Serum Institute of India Pvt. Ltd., Индия) в виде лиофилизата для приготовления раствора для приема внутрь, содержащую пять реассортантных штаммов ротавируса

³ ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁴ ФС.3.3.1.0037.15 Вакцина полиомиелитная пероральная 1, 2, 3 типов, раствор для приема внутрь. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁵ ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁶ ОФС.1.7.2.0011.15 Требования к клеточным культурам-субстратам производства иммунобиологических препаратов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

(человеческие и бычьи) серотипов G1, G2, G3, G4 и G9, выращенных на культуре клеток линии Vero. Все штаммы содержат антиген VP7 соответствующего серотипа из штаммов человеческих вирусов, реассортантных с бычьим ротавирусом (UK).

Культивирование и заражение клеточных линий вирусом

Клетки линии Vero выращивали до образования однородного монослоя (в среднем 5–6 сут). Клеточный монослой обрабатывали 0,25% раствором трипсина (ООО «БиолоТ», Россия) для получения клеточной взвеси. Клетки разводили до концентрации 100–150 тыс./мл в ростовой среде DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) с содержанием 5–10% ЭТС и рассевали в культуральные флаконы (Greiner Bio-One, Германия) с площадью поверхности 175 см². Инкубацию клеток проводили при температуре 37 °С и 5% CO₂.

Клеточный монослой перед заражением промывали три раза раствором Хенкса. Штаммы-кандидаты ротавируса перед нанесением на монослой клеток обрабатывали раствором Хенкса, содержащим трипсин (20 мкг/мл), и проводили адсорбцию вируса на клетки при температуре 37 °С, после чего добавляли среду DMEM до первоначального объема. Далее проводили ежедневное наблюдение зараженных клеток под микроскопом до появления изменений структуры монослоя и морфологии клеток. Критерием адаптации штаммов-кандидатов ротавируса к росту на клетках линии Vero являлось стабильное ЦПД в последовательных пассажах. Первые пассажи на этапе переадаптации проводились в сравнении с заражением клеток СПЭВ штаммом SA11 № 2364 ГКВ, проявляющим стабильную инфекционную активность не ниже 9,0±0,2 lg ТЦД₅₀/мл (50% тканевая цитопатическая доза).

Выполняли молекулярно-генетический анализ штаммов ротавируса с использованием секвенирования по Сэнгеру с помощью генетического анализатора «Нанофор 05» (ООО «НПФ «Синтол», Россия) и набора реагентов производства ООО «НПФ «Синтол».

Определение инфекционной активности штаммов вируса

Инфекционную активность кандидатных штаммов ротавируса, выращенных на клетках линии Vero, определяли методом титрования вируса [21]. Титрование вируса проводили на клетках линии СПЭВ. Для этого готовили разведения вируса от 10¹ до 10⁻⁶ и с помощью

каждого разведения заражали клетки СПЭВ в культуральных флаконах. Использовали следующие контроли: контроль интактной культуры клеток линии СПЭВ; контроль клеток СПЭВ в присутствии трипсина; контроль инфекционной активности ротавируса вида А (неразведенный вирус).

Учет зараженных клеточных культур вели до наступления цитопатического действия и рассчитывали показатель ТЦД₅₀ по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали его в lg ТЦД₅₀/мл [22].

Характеристика антигенной активности штаммов вируса методом иммуоферментного анализа

Методом иммуоферментного анализа (ИФА) устанавливали титры антигенов ротавируса в неинaktivированных штаммах и в композиции инаktivированных штаммов.

Определение титров проводили при помощи тест-системы «Ротавирус-антиген-ИФА-Бест» (АО «Вектор-Бест», Россия). Метод определения основан на твердофазном ИФА с применением моноклональных антител к группоспецифическому антигену VP6 ротавируса человека и конъюгата поликлональных антител с пероксидазой хрена.

В качестве групп сравнения использовали препарат коммерческой вакцины пентавалентной живой для профилактики ротавирусной инфекции и стандартизированный штамм ротавируса вида А SA-11 № 2364 ГКВ.

Подбор оптимальных условий инаktivации штаммов-кандидатов ротавируса вида А

Для инаktivации штаммов-кандидатов использовали растворы 0,1; 0,05; 0,03; 0,025% формальдегида. Инаktivацию проводили при температуре 27 и 37 °С. Данные регистрировали на 5, 10, 30 сут. При оценке специфической безопасности (контроль полноты инаktivации) использовали метод, включающий проведение 3 серийных пассажей штаммов ротавируса после обработки раствором формальдегида. Каждой пробой инаktivированных штаммов проводили заражение монослоя клеток линии СПЭВ. Использовали следующие контроли: интактная культура клеток линии СПЭВ; клетки СПЭВ после воздействия раствора формальдегида; контроль инфекционной активности нативного вируса. Последовательные заражения проводили независимо от характера ЦПД до трех пассажей. Положительным результатом считали тот, в котором при последовательных заражениях культуры клеток линии СПЭВ инаktivированным

вирусом отсутствовало ЦПД в трех заражениях; отрицательным результатом – в случае если при любом из последовательных заражений культуры клеток инактивированным вирусом наблюдалось минимальное проявление ЦПД. Критерием инактивации вирионов являлась потеря инфекционных свойств ротавируса по отношению к культуре клеток линии СПЭВ.

Лабораторные животные

Эксперименты проводили на белых нелинейных мышах в возрасте 6–8 нед. обоего пола (масса 19–21 г). Лабораторные животные были выращены в условиях конвенционального вивария ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора. В период проведения исследования животных содержали в изолированном помещении вивария при температуре 22–24 °С и относительной влажности воздуха не выше 60% в условиях свободного доступа к корму и воде на стандартном рационе кормления. Работу с животными проводили в соответствии с международными и национальными требованиями⁷. Протокол исследования одобрен Биоэтической комиссией ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора (протокол № 05/17 от 23.05.2023).

Оценка иммуногенной активности нативных штаммов и композиции инактивированных штаммов-кандидатов ротавируса вида А

Для оценки иммуногенной активности штаммов вирусов проводили иммунизацию мышей в количестве 70 особей (7 групп; 10 животных в группе) с использованием нативных штаммов, композиции инактивированных штаммов, стандартизированного штамма SA-11 № 2364 ГКВ; в качестве контроля применяли физиологический раствор (табл. 1). Прививочную дозу нативных штаммов-кандидатов ротавируса вида А (объем 0,2 мл) выражали в lg ТЦД₅₀ [22]. Прививочную дозу композиции инактивированных штаммов (объем 0,2 мл) определяли до процесса инактивации и выражали в lg ТЦД₅₀ [22].

Через 28 сут после иммунизации у животных отбирали кровь и в образцах сыворотки определяли титр антител к ротавирусу вида А с помощью метода твердофазного гетерогенного непрямого ИФА. Схема ИФА включала в себя сорбцию антигена – ротавируса вида А штамма SA-11 № 2364 ГКВ с концентрацией вирусных

частиц не менее 10^7 – 10^8 в 1 мл культуральной жидкости, внесение образцов исследуемых сывороток и конъюгата антител козы (к суммарным IgG, IgA, IgM мыши) с пероксидазой хрена (ООО «Имтек», Россия). Методика включала обязательный этап отмывки реагентов от непрореагировавших компонентов на каждой стадии, в результате чего на последнем этапе анализа оставались антитела к ротавирусу вида А, содержащие суммарные иммуноглобулины классов G, A, M мыши к антигенам цельной ротавирусной частицы.

Статистические методы

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета программы Microsoft Office Excel 2010, рассчитывая значения среднего геометрического титра антител и доверительные интервалы для каждой группы образцов сыворотки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Адаптация штаммов к росту на культуре клеток линии Vero и культивирование кандидатных штаммов ротавируса вида А

На первом этапе работы было проведено исследование чувствительности к штаммам ротавируса человека вида А клеток линии Vero, которые наиболее часто используются при разработке вирусных вакцин [19].

На клетках линии Vero в ходе первых пассажей штаммов ротавируса выявлен низкий уровень ЦПД, не достигающий 80% в течение 14 сут (табл. 2). Начиная с 3–4 пассажа наблюдали увеличение уровня ЦПД с сокращением сроков его проявления – от 5 до 11 сут в зависимости от штамма.

Для исключения кросс-контаминации образцов штаммов проводили их контроль методом секвенирования по Сэнгеру. Анализ показал, что нуклеотидная последовательность штаммов после заражения клеточного субстрата осталась прежней (данные запланированы к опубликованию).

В ходе исследований были получены штаммы ротавируса вида А, стабильно реплицирующиеся на перевиваемых клетках линии Vero. Установлено, что ЦПД изучаемых штаммов вируса характеризуется различной величиной и сроками наступления (табл. 2).

Для каждого из кандидатных штаммов, выращенных на перевиваемых клетках линии Vero,

⁷ Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей. ETS N 123. Страсбург; 1986.

Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Таблица 1. Схема иммунизации мышей
Table 1. Mouse immunisation scheme

Группа (n=10) <i>Group (n=10)</i>	Препарат для иммунизации <i>Preparation used for immunisation</i>	Прививочная доза <i>Immunisation dose</i>	Способ введения <i>Route of administration</i>		
			1 сут <i>Day 1</i>	7 сут <i>Day 7</i>	14 сут <i>Day 14</i>
1	Нативный штамм RRV-4 <i>Native strain RRV-4</i>	8,3 lg ТЦД ₅₀ /0,2 мл <i>8.3 log₁₀ TCID₅₀/0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>
2	Нативный штамм RRV-5 <i>Native strain RRV-5</i>	7,3 lg ТЦД ₅₀ /0,2 мл <i>7.3 log₁₀ TCID₅₀/0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>
3	Нативный штамм RRV-6 <i>Native strain RRV-6</i>	8,3 lg ТЦД ₅₀ /0,2 мл <i>8.3 log₁₀ TCID₅₀/0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>
4	Нативный штамм RRV-7 <i>Native strain RRV-7</i>	7,3 lg ТЦД ₅₀ /0,2 мл <i>7.3 log₁₀ TCID₅₀/0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>
5	Композиция инактивированных штаммов <i>Inactivated strain composition</i>	7,8 lg ТЦД ₅₀ /0,2 мл <i>7.8 log₁₀ TCID₅₀/0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>
6	Стандартизированный штамм SA-11 № 2364 ГКВ <i>Standard strain SA-11 NVC 2364</i>	9,3 lg ТЦД ₅₀ /0,2 мл <i>9.3 log₁₀ TCID₅₀/0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>
7	Физиологический раствор <i>Normal saline</i>	0,2 мл <i>0.2 mL</i>	в/м <i>i.m.</i>	в/б <i>i.p.</i>	в/м <i>i.m.</i>

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

Примечание. ТЦД₅₀ – 50% тканевая цитопатическая доза; в/м – внутримышечно; в/б – внутрибрюшинно.
Note. TCID₅₀, 50% tissue culture infectious dose; i.m., intramuscular; i.p., intraperitoneal.

Таблица 2. Показатели динамики проявления цитопатического действия вируса (ЦПД) при адаптации штаммов ротавируса вида А к культуре клеток линии Vero
Table 2. Indicators of changes in the cytopathic effect (CPE) with adaptation of human rotavirus A strains to Vero cells

Штаммы <i>Strains</i>	Время проявления (сут) и уровень ЦПД в зависимости от номера пассажа вируса на культуре клеток линии Vero <i>CPE onset time (day) and level depending on the passage number in Vero cells</i>									
	1 пассаж <i>Passage 1</i>		2 пассаж <i>Passage 2</i>		3 пассаж <i>Passage 3</i>		4 пассаж <i>Passage 4</i>		5 пассаж <i>Passage 5</i>	
	ЦПД, % <i>CPE, %</i>	Сут <i>Day</i>	ЦПД, % <i>CPE, %</i>	Сут <i>Day</i>	ЦПД, % <i>CPE, %</i>	Сут <i>Day</i>	ЦПД, % <i>CPE, %</i>	Сут <i>Day</i>	ЦПД, % <i>CPE, %</i>	Сут <i>Day</i>
RRV-4	40	14	80	14	80	8	100	7	100	5
RRV-5	30	14	30	14	50	14	50–70	12	100	9
RRV-6	20	14	20	14	30	10	80	10	90	10
RRV-7	20	14	40	14	50	10	50–60	10	100	9
SA-11 № 2364 ГКВ <i>SA-11 NVC 2364</i>	100	4	100	4	100	3	100	4	100	4

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

Примечание. SA-11 № 2364 ГКВ – стандартизированный штамм.

Note. SA-11 NVC 2364 is the standard rotavirus strain deposited at the National Virus Collection of the Russian Federation.

был определен инфекционный титр, значение которого составило для штамма вируса RRV-4 – 8,9 lg ТЦД₅₀/мл; RRV-5 – 7,9 lg ТЦД₅₀/мл; RRV-6 – 8,9 lg ТЦД₅₀/мл; RRV-7 – 7,9 lg ТЦД₅₀/мл. Таким образом, штаммы-кандидаты имели различную инфекционную активность на культуре клеток Vero, что свидетельствует о разной тропности

поверхностных антигенов вирусов к клеточным рецепторам.

Инактивация штаммов-кандидатов ротавируса вида А

Технология производства инактивированных вирусных вакцин (против вирусов полиомиелита,

гриппа и др.) является наиболее безопасной, однако требует подбора оптимальных условий [23–25].

При отработке условий инактивации кандидатных штаммов ротавируса были определены варианты инактивации, сочетающие в себе разную концентрацию формальдегида,

температурный режим и продолжительность обработки штаммов (табл. 3).

Представленные данные свидетельствуют о том, что инактивация вирусов наступала при температуре 37 °С и концентрации формальдегида от 0,05 до 0,025% в зависимости от длительности обработки. В тесте при оценке

Таблица 3. Результаты подбора условий инактивации штаммов ротавируса человека RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7
Table 3. Results of selecting inactivation conditions for human rotavirus strains RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7

Концентрация формальдегида, % <i>Formaldehyde concentration, %</i>	Температура инактивации, °С <i>Inactivation temperature, °C</i>	Период инактивации, сут <i>Inactivation time, days</i>	Контроль полноты инактивации вируса на культуре клеток линии СПЭВ <i>Control of viral inactivation completeness in SPEV cells</i>				
			Контроль (воздействие раствора формальдегида), ЦПД, % <i>Control with formaldehyde solution, CPE (%)</i>	Контроль инфекционности нативного вируса, ЦПД, % <i>Control of native virus infectivity, CPE (%)</i>	Результат инактивации <i>Inactivation result</i>		
					ЦПД после заражения на 1 пассаже, % <i>Infection after passage 1, CPE (%)</i>	ЦПД после заражения на 2 пассаже, % <i>Infection after passage 2, CPE (%)</i>	ЦПД после заражения на 3 пассаже, % <i>Infection after passage 3, CPE (%)</i>
0,1	27	5	100	100	100	0	0
		10	100	100	100	0	0
		30	100	100	100	0	0
	37	5	100	100	100	0	0
		10	100	100	100	0	0
		30	100	100	100	0	0
0,05	27	5	100	100	100	0	0
		10	100	100	100	0	0
		30	100	100	100	0	0
	37	5	80	100	100	0	0
		10	80	100	100	0	0
		30	80	100	100	0	0
0,03	27	5	5	50	100	50	0
		10	10	50	100	50	0
		30	30	80	100	50	0
	37	5	5	80	100	80	5
		10	10	80	100	80	0
		30	30	50	100	50	0
0,025	27	5	50	100	50	10	10
		10	50	100	50	20	10
		30	50	100	50	10	10
	37	5	50	100	50	10	10
		10	50	100	50	3	0
		30	50	100	50	0	0

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

Примечание. СПЭВ – клетки свиной почки эмбриональной; ЦПД – цитопатическое действие вируса.
Note. SPEV, pig embryo kidney cells; CPE, cytopathic effect of the virus.

специфической безопасности (контроль полноты инактивации) показано отсутствие инфекционных вирусных частиц.

Сравнительную антигенную активность неинактивированных (нативных) культуральных штаммов ротавируса и композиции инактивированных штаммов в сравнении с коммерческой ротавирусной пентавалентной, живой вакциной определяли методом ИФА по содержанию антигена VP6 (табл. 4).

Выявленные для нативных штаммов вируса значения титров составили от 1:32 до 1:64, что может являться характерной особенностью штаммов для этого способа культивирования при постановке реакции ИФА. Титр антигенов в композиции инактивированных штаммов был ожидаемо ниже, чем у нативных штаммов, так как в процессе инактивации при температуре 37 °С вирусные белки подвергаются конформационным изменениям в условиях длительного воздействия формальдегида. Следует отметить, что содержание антигена VP6 в нативных штаммах оказалось сопоставимо с таковым в образцах коммерческой вакцины и стандартизированного штамма.

Сравнительная иммуногенность нативных и инактивированных штаммов ротавируса

Защитная роль специфичных антител к ротавирусу вида А при иммунизации инактивированными вакцинами показана при использовании различных животных моделей, в том числе мышей [23]. Формирование гуморального иммунного ответа (по оценке сывороточных иммуноглобулинов классов А, G, М) выявлено при иммунизации с помощью разных способов введения инактивированной вакцины, при этом показано, что на полноту иммунного ответа влияет наличие белковых антигенов VP6, VP7, VP4 [23, 26].

В данной работе для исследования иммуногенности использовалась модель мышей как наиболее удобная для изучения формирования гуморального иммунитета и контроля иммуногенности препарата. Для сравнительной оценки иммуногенности нативных штаммов и композиции инактивированных штаммов был использован метод ИФА (непрямой гетерогенный вариант) (табл. 5).

Продемонстрировано, что нативные штаммы и композиция инактивированных штаммов, введенные мышам парентерально, обладали специфической иммуногенной активностью. Значения уровней антител при иммунизации как в случае композиции инактивированных штаммов, так и в случае нативных штаммов оказались сопоставимы и отличались от фоновых значений (иммунизация физиологическим раствором). Это свидетельствует о сохранении вышеуказанными штаммами после инактивации функционально активных структур антигенспецифических эпитопов, инициирующих формирование антител.

На рисунке 1 представлены обобщенные данные по уровню антигенной активности и иммуногенности нативных штаммов, а также композиции инактивированных штаммов. Установлено, что между уровнем антителообразования и уровнем антигенной активности используемых штаммов не во всех случаях выявлена прямая зависимость. Композиция инактивированных штаммов ротавируса при меньшем уровне антигенной активности в сравнении с нативными штаммами инициировала формирование более высокого иммунного ответа с некоторыми нативными штаммами. Согласно данным литературы при первичной и вторичной ротавирусной инфекции формируются гомо- и гетеротипические антитела, способные нейтрализовать различные штаммы ротавируса вида А⁸ [10]. Полученные в данной работе результаты свидетельствуют

Таблица 4. Антигенная активность нативных штаммов ротавируса человека RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7, а также композиции инактивированных штаммов методом иммуноферментного анализа

Table 4. Antigenicity of native RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7 strains and the inactivated strain composition determined by enzyme immunoassay

Параметр <i>Parameter</i>	RRV-4	RRV-5	RRV-6	RRV-7	Композиция инактивированных штаммов* <i>Inactivated strain composition*</i>	Коммерческая ротавирусная вакцина# <i>Commercial rotavirus vaccine#</i>	Стандартизированный штамм <i>Standard strain</i>
Титр антигенов <i>Antigen titre</i>	1:64	1:32	1:64	1:32	1:16	1:64	1:64

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

Примечание. * состав композиции включал инактивированные штаммы: RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7; # вакцина для профилактики ротавирусной инфекции, пентавалентная, живая. Стандартизированный штамм – штамм SA-11 № 2364 ГКБ.

Note. *, composition including inactivated RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7 strains. #, pentavalent live vaccine for rotavirus prevention; standard strain SA-11 NVC 2364 (National Virus Collection of the Russian Federation).

Таблица 5. Уровень специфических антител в образцах сыворотки крови мышей, иммунизированных с использованием нативных штаммов ротавируса человека RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7, а также композиции инактивированных штаммов
Table 5. Serum levels of antigen-specific antibodies in mice immunised with native human rotavirus strains RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7 and the inactivated strain composition

Параметр <i>Parameter</i>	RRV-4	RRV-5	RRV-6	RRV-7	Композиция инактивированных штаммов* <i>Inactivated strain composition*</i>	Стандартизированный штамм <i>Standard strain</i>	Физиологический раствор <i>Normal saline</i>
Среднее геометрическое значение титров антител, ед. ИФА/мл <i>Geometric mean of antibody titres, EIA units/mL</i>	373,2 (355,4–392,6)	282,8 (276,1–290,1)	141,4 (137,8–145,0)	174,1 (165,4–182,6)	246,2 (242,1–250,3)	400,0 (388,9–412,9)	90,1

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

Примечание. * состав композиции включал инактивированные штаммы: RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7. Стандартизированный штамм – штамм SA-11 № 2364 ГКБ; ИФА – иммуноферментный анализ.

Note. *, composition including inactivated RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7 strains. Standard strain SA11 NVC 2364 (National Virus Collection of the Russian Federation). EIA, enzyme immunoassay.

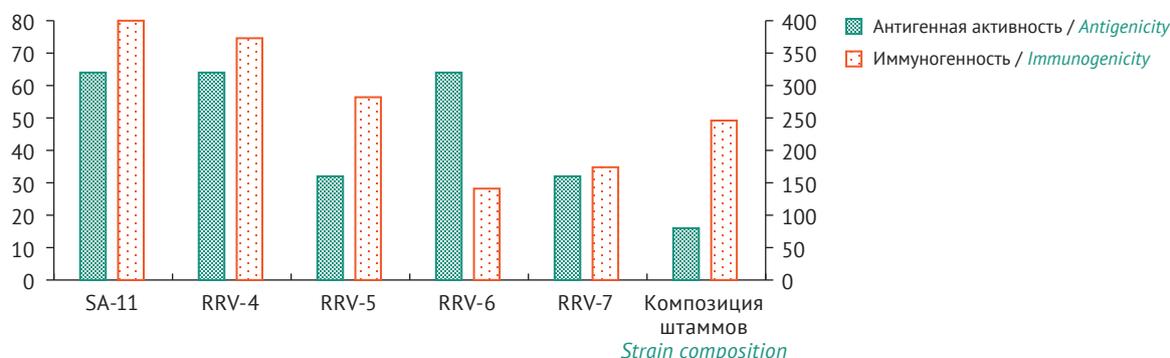


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Антигенная активность и иммуногенность нативных штаммов ротавируса вида А (SA-11, RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7) и композиции инактивированных штаммов (RRV-4, RRV-5, RRV-6, RRV-7). По оси Y – антигенная активность, титры антигенов (по левой оси) и иммуногенность, титры антител (по правой оси).

Fig. 1. Antigenicity and immunogenicity of native rotavirus group A strains (SA-11, RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7) and the inactivated strain composition (based on RRV-4, RRV-5, RRV-6, and RRV-7 strains). The Y-axis represents antigenicity with antigen titres (on the left) and immunogenicity with antibody titres (on the right).

о том, что композиция инактивированных штаммов, по-видимому, индуцирует гетеротипический иммунный ответ за счет наличия перекрестнореактивных эпитопов. Однако вопрос механизма формирования иммунного ответа при ротавирусной иммунизации, в том числе индукции гомо- и гетеротипических антител, требует дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Получены кандидатные штаммы ротавируса вида А, стабильно реплицирующиеся на перевиваемых клетках линии Vero, с уровнем инфекционной активности от 8,9 до 7,9 lg ТЦД₅₀/мл и с концентрацией, достаточной для создания вакцинного препарата.

2. Инактивация штаммов-кандидатов ротавируса вида А достигается при температуре 37 °С и концентрации формальдегида от 0,05 до 0,025% в зависимости от длительности обработки. При инактивации вирусы теряют свою инфекционную активность, что было показано в тесте специфической безопасности (контроль полноты инактивации).
4. После инактивации штаммов-кандидатов сохраняется антигенная активность капсидных белков (VP6) и иммуногенная активность штаммов при парентеральном введении мышам.
5. Культуральные штаммы-кандидаты, полученные на клетках линии Vero, обладают специфическими антигенными свойствами рота-

⁸ Морозова ОВ. Генотиповое разнообразие и филодинамика циркулирующих на территории России ротавирусов, сравнение с вакцинными штаммами: дис. ... канд. биол. наук. М.; 2021.

- вируса вида А, позволяющими инициировать формирование у мышей специфического гуморального иммунного ответа, регистрируемого по уровню сывороточных иммуноглобулинов классов А, G, М при постановке непрямого гетерогенного варианта ИФА.
- Показано, что между уровнем антигенной активности (титр антигена) и уровнем иммуногенности (титр антител) используемых штаммов не во всех случаях выявлена прямая зависимость.
 - Для оценки иммуногенных свойств инактивированных штаммов ротавируса вида А достаточно применения экспериментальной мышинной модели. Определение иммуногенности важно для характеристики антигена ротавируса на этапах производства кандидатной вакцины для оценки ее качества по показателю «Подлинность».
 - Антитела к ротавирусу вида А, полученные при иммунизации, целесообразно использовать в тест-системе для контроля промежуточных продуктов в процессе производства вакцины.
 - Представленные данные позволяют рассматривать полученную композицию инактивированных штаммов ротавируса вида А в качестве основы для создания инактивированной ротавирусной вакцины.

Литература/References

- Бондарев ВП, Шевцов ВА, Индикова ИН, Евреинова ЕЭ, Горенков ДВ. Эпидемиология ротавирусной инфекции и тактика вакцинопрофилактики. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(2):81–7. Bondarev VP, Shevtsov VA, Indikova IN, Evreinova EE, Gorenkov DV. Rotavirus epidemiology and vaccination tactics. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(2):81–7 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-2-81-87>
- De Grazia S, Filizzolo C, Bonura F, Pizzo M, Di Bernardo F, Collura A, et al. Identification of a novel intra-genotype reassortant G₁P[8] rotavirus in Italy, 2021. *Int J Infect Dis*. 2024;140:113–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2024.01.020>
- Маянский НА, Куличенко ТВ, Маянский АН. Ротавирусная инфекция: эпидемиология, патология, вакцинопрофилактика. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2015;70(1):47–54. Mayansky NA, Kulichenko TV, Mayansky AN. Rotavirus infection: epidemiology, pathology, vaccination. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015;70(1):47–54 (In Russ.). <https://doi.org/10.15690/vramn.v70i1.1231>
- Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17083. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
- Sadiq A, Bostan N, Khan J, Aziz A. Effect of rotavirus genetic diversity on vaccine impact. *Rev Med Virol*. 2022;32(1):e2259. <https://doi.org/10.1002/rmv.2259>
- Jain S, Vashist J, Changotra H. Rotaviruses: is their surveillance needed? *Vaccine*. 2014;32(27):3367–78. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.037>
- Коровкин АС, Игнатьев ГМ. Результаты и перспективы вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции в Российской Федерации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):499–512. Korovkin AS, Ignatyev GM. Results and prospects of rotavirus immunisation in the Russian Federation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):499–512 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-499-512>
- Burke RM, Tate JE, Dahl RM, Aliabadi N, Parashar UD. Rotavirus vaccination is associated with reduced seizure hospitalization risk among commercially insured US children. *Clin Infect Dis*. 2018;67(10):1614–6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy424>
- Bibera GL, Chen J, Pereira P, Benninghoff B. Dynamics of G2P[4] strain evolution and rotavirus vaccination: a review of evidence for Rotarix. *Vaccine*. 2020;38(35):5591–600. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.059>
- Кондакова ОА, Никитин НА, Трифонова ЕА, Атабеков ИГ, Карпова ОВ. Вакцины против ротавируса: новые стратегии и разработки. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2017;72(4):199–208. EDN: ZISVQL
- Kondakova OA, Nikitin NA, Trifonova EA, Atabekov IG, Karpova OV. Rotavirus vaccines: new strategies and approaches. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2017;72(4):169–78. <https://doi.org/10.3103/S0096392517040071>
- Wang Y, Li J, Liu P, Zhu F. The performance of licensed rotavirus vaccines and the development of a new generation of rotavirus vaccines: a review. *Hum Vaccin Immunother*. 2021;17(3):880–96. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1801071>
- Burke RM, Tate JE, Kirkwood CD, Steele AD, Parashar UD. Current and new rotavirus vaccines. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(5):435–44. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000572>
- Zhou Y, Wu J, Hu X, Chen R, Lin X, Yin N, et al. Immunogenicity of inactivated rotavirus in rhesus monkey, and assessment of immunologic mechanisms. *Hum Vaccin Immunother*. 2023;19(1):2189598. <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2189598>
- Костина ЛВ, Филатов ИЕ, Елисеева ОВ, Латышев ОЕ, Чернорыж ЯЮ, Юрлов КИ и др. Исследование безопасности и иммуногенности вакцины на основе VLP для профилактики ротавирусной инфекции на модели новорожденных карликовых свиней. *Вопросы вирусологии*. 2023;68(5):415–27. Kostina LV, Filatov IE, Eliseeva OV, Latyshev OE, Chernoryzh YaYu, Yurlov KI, et al. Study of the safety and immunogenicity of VLP-based vaccine for the prevention of rotavirus infection in neonatal minipig model. *Problems of Virology*. 2023;68(5):415–27 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0507-4088-194>
- Fellows T, Page N, Fix A, Flores J, Cryz S, McNeal M, et al. Association between immunogenicity of a monovalent parenteral P2-VP8 subunit rotavirus vaccine and fecal shedding of rotavirus following Rotarix challenge during a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Viruses*. 2023;15(9):1809. <https://doi.org/10.3390/v15091809>
- Сейдахметова БА, Жаппарова ГА, Мараховская ЛГ, Теребай АА, Наханов АК. Масштабирование культуры клеток Vero для производства биопрепаратов. *Биобезопасность и биотехнология*. 2022;(9):44–52. Seidakhmetova BA, Zhapparova GA, Marakhovskaya LG, Terebay AA, Nakhanov AK. Scaling of Vero cell culture for the production of biological products. *Biosafety and Biotechnology*. 2022;(9):44–52 (In Russ.). <https://doi.org/10.58318/2957-5702-2022-9-44-52>
- Каа КВ, Игнатьев ГМ, Синюгина АА, Ишмухаметов АА. Чувствительность клеточных линий к вирусу Чикунгунья и подбор метода наработки вирусного материала в промышленных объемах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):111–120. Kaа KV, Ignatyev GM, Sinyugina AA, Ishmukhametov AA. Suscepti-

- bility of various cell lines to the *Chikungunya virus* and method selection for commercial-scale production of viral material. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):111–120 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-111-120>
18. Грачев ВП, Хапчаев ЮХ. Применение перевиваемых линий клеток человека и животных для изготовления вирусных вакцин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008;(1):82–90. Grachev VP, Kharchaev YuKh. Use of continuous human and animal cell lines for the production of viral vaccines. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2008;(1):82–90 (In Russ.). EDN: [IJPFAR](https://doi.org/10.1586/erv.09.19)
 19. Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Exp Rev Vaccines*. 2009;8(5):607–18. <https://doi.org/10.1586/erv.09.19>
 20. Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol*. 2011;740:7–12. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_2
 21. Белоусова РВ, Троценко НИ, Преображенская ЭА. *Практикум по ветеринарной вирусологии*. Москва: КолосС; 2013. Belousova RV, Trotsenko NI, Preobrazhenskaya EA. *Workshop on veterinary virology*. Moscow: KolosS; 2013 (In Russ.).
 22. 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.).
 23. Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. Inactivated rotavirus vaccines: a priority for accelerated vaccine development. *Vaccine*. 2008;26(52):6754–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.008>
 24. Евреинова ЕЭ, Хантиминова ЛМ, Шевцов ВА, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Перспективные направления в совершенствовании вакцин для профилактики полиомиелита. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):142–53. Evreinova EE, Khantimirova LM, Shevtsov VA, Merkulov VA, Bondarev VP. Promising opportunities to improve polio vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):142–53 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-336>
 25. Отрашевская ЕВ, Трухин ВП, Меркулов ВА, Игнатъев ГМ. Прогресс в разработке вакцин для профилактики лихорадки Чикунгунья и перспективы появления на рынке. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):42–64. Otrasheskaja EV, Trukhin VP, Merkulov VA, Ignatyev GM. Chikungunya vaccines: advances in the development and prospects for marketing approval. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):42–64 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-42-64>
 26. Coffin SE, Moser KA, Cohen S, Clark HF, Offit PA. Immunologic correlates of protection against rotavirus challenge after intramuscular immunization of mice. *J Virol*. 1997;71(10):7851–6. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.10.7851-7856.1997>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **М.В. Коврижко** — концепция исследования, формирование цели и задач исследований, написание и редактирование текста рукописи; **Е.П. Колпакова** — концепция исследования, написание текста рукописи, выполнение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация результатов; **Д.С. Колпаков** — обсуждение результатов исследования и подготовка текста рукописи; **Т.И. Твердохлебова** — обсуждение и редактирование текста рукописи; **Е.С. Курбатов** — подготовка иллюстративного материала и редактирование текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования одобрен Биоэтической комиссией ФБУН Ростов-НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора (протокол № 05/17 от 23.05.2023).

Authors' contributions. All authors confirm that their authorship meets the ICMJE criteria. The most significant contributions were as follows. **M.V. Kovrizhko** conceptualised the study, formulated its aim and objectives, drafted and edited the manuscript. **E.P. Kolpakova** conceptualised the study, drafted the manuscript, conducted the experiments, analysed and interpreted the results. **D.S. Kolpakov** discussed the study results and prepared the manuscript for submission. **T.I. Tverdokhlebova** discussed and edited the manuscript. **E.S. Kurbatov** prepared the illustrative material and edited the manuscript.

Ethics approval. The study protocol was approved by the Bioethics Commission of the Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology of the Federal Service for Surveillance in Healthcare (Protocol No. 05/17 of 23 May 2023).

Об авторах / Authors

Коврижко Марина Владимировна / Marina V. Kovrizhko

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6571-7895>

Колпакова Елена Павловна / Elena P. Kolpakova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8090-2845>

Колпаков Дмитрий Сергеевич / Dmitry S. Kolpakov

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-7604-4631>

Твердохлебова Татьяна Ивановна, д-р мед. наук, доц. / Tatiana I. Tverdokhlebova, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3912-0291>

Курбатов Егор Сергеевич / Egor S. Kurbatov

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-2017-2974>

Поступила 22.04.2024

После доработки 18.10.2024

Принята к публикации 06.12.2024

Received 22 April 2024

Revised 18 October 2024

Accepted 6 December 2024



Проблема лекарственной устойчивости вируса SARS-CoV-2 к препаратам прямого противовирусного действия

Е.Л. Гасич^{1,✉}, Е.Н. Кроткова², А.Д. Коско¹, К.Ю. Булда¹, А.Г. Красько¹,
Е.А. Дорофеева³, И.А. Карпов⁴

¹ Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», ул. Казинца, д. 50, г. Минск, 220099, Республика Беларусь

² Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», ул. Долгиновский тракт, д. 157, г. Минск, 220080, Республика Беларусь

³ Учреждение здравоохранения «32-я городская клиническая поликлиника», ул. Голубева, д. 25, г. Минск, 220117, Республика Беларусь

⁴ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», пр. Дзержинского, д. 83, г. Минск, 220083, Республика Беларусь

✉ Гасич Елена Леонидовна; elena.gasich@gmail.com

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Геном SARS-CoV-2 характеризуется высокой частотой мутаций, в связи с чем особое беспокойство вызывает проблема резистентности вируса к современным противовирусным препаратам – ингибиторам основной протеазы (3CLpro) и РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp).

ЦЕЛЬ. Проанализировать сведения о частоте встречаемости, спектре и причинах формирования мутаций лекарственной устойчивости вируса SARS-CoV-2 к ингибиторам основной протеазы и РНК-зависимой РНК-полимеразы, применяемым в клинической практике или находящимся в стадии разработки, на основе клинических, вирусологических и генотипических данных.

ОБСУЖДЕНИЕ. Анализ частоты встречаемости мутаций лекарственной устойчивости в геноме вируса SARS-CoV-2 к противовирусным препаратам (ингибиторы RdRp – ремдесивир и молнупиравир; ингибиторы протеазы 3CLpro – паксловид) за 2021–2024 гг. показал, что некоторые мутации существовали до начала использования препаратов. Уровень распространенности мутаций лекарственной резистентности в мире не превышает 0,5%. Однако согласно результатам клинических и экспериментальных исследований продемонстрирована возможность снижения восприимчивости к препаратам более чем в 200 раз, в том числе и с формированием мультирезистентных вариантов вируса SARS-CoV-2, что особенно актуально для пациентов с иммуносупрессией. У таких пациентов SARS-CoV-2 может сохраняться в течение многих месяцев, и противовирусный препарат может потерять свою эффективность по мере отбора или появления спонтанных мутаций, создавая риск распространения лекарственно-устойчивых штаммов и/или неблагоприятного исхода для пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В связи с увеличением охвата лечением пациентов с COVID-19 существует риск роста резистентных вариантов вируса. Представленные данные свидетельствуют о необходимости проведения геномного эпидемиологического надзора с анализом потенциальных мишеней действия лекарственных препаратов с учетом данных клинического наблюдения пациентов, что в будущем может определять тактику терапии и необходимость разработки новых противовирусных препаратов (ингибиторов RdRp и протеаз), адаптированных к лекарственно-устойчивым вариантам SARS-CoV-2.

Ключевые слова: лекарственная устойчивость; COVID-19; SARS-CoV-2; противовирусная терапия; мутации; ремдесивир; паксловид; 3CLpro; RdRp

Для цитирования: Гасич Е.Л., Кроткова Е.Н., Коско А.Д., Булда К.Ю., Красько А.Г., Дорофеева Е.А., Карпов И.А. Проблема лекарственной устойчивости вируса SARS-CoV-2 к препаратам прямого противовирусного действия. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(4):415–427. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-569>

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований «Трансляционная медицина» (подпрограмма «Фундаментальные аспекты медицинской науки») по заданию 1.29 «Изучить влияние мутаций лекарственной устойчивости вируса SARS-CoV-2 на течение заболевания и эффективность применения средств противовирусного действия для лечения COVID-19 в отношении актуальных штаммов вируса и разработать алгоритм молекулярно-генетических исследований для их выявления» (Рег. № НИР 20230286).

Потенциальный конфликт интересов. Е.Л. Гасич является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» (с 2024 г.). Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The problem of SARS-CoV-2 virus resistance to direct-acting antivirals

Elena L. Gasich^{1,✉}, Elena N. Krotkova², Anastasiya D. Kasko¹, Kirill Yu. Bulda¹, Anatoli G. Krasko¹, Elizaveta A. Dorofeeva³, Igor A. Karpov⁴

¹ Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, 50 Kazinets St., Minsk 220099, Republic of Belarus

² Republican Scientific and Practical Center of Pulmonology and Phthiology, 157 Dolginovsky Rd, Minsk 220080, Republic of Belarus

³ 32nd City Clinical Clinic, 25 Golubev St., Minsk 220117, Republic of Belarus

⁴ Belarusian State Medical University, 83 Dzerzhinsky Ave, Minsk 220083, Republic of Belarus

✉ Elena L. Gasich; elena.gasich@gmail.com

ABSTRACT

INTRODUCTION. The high prevalence of mutations in the SARS-CoV-2 genome raises particular concerns about the resistance of the virus to current antiviral therapy, including inhibitors of the main protease, or 3C-like protease (3CLpro), and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp).

AIM. This study aimed to analyse the prevalence, spectrum, and causes of SARS-CoV-2 mutations conferring resistance to approved and pipeline RdRp and 3CLpro inhibitors on the basis of clinical, virological, and genotypic data.

DISCUSSION. The authors have analysed the prevalence of SARS-CoV-2 mutations conferring resistance to antivirals (RdRp inhibitors, including remdesivir and molnupiravir, and 3CLpro inhibitors, including paxlovid) in 2021–2024. The results suggest that certain mutations existed prior to the use of these antivirals. The prevalence of resistance-conferring mutations does not exceed 0.5% of the global population. However, the results of clinical and experimental studies demonstrate the possibility of a more than 200-fold reduction in susceptibility to medicinal products and, in particular, the emergence of multidrug-resistant variants. This is especially important for immunocompromised patients. SARS-CoV-2 can persist in such patients for many months, during which spontaneous or selection-driven mutations can render antiviral therapy ineffective. This would create a risk of spreading drug-resistant variants and/or a risk of adverse outcomes for patients.

CONCLUSIONS. As COVID-19 treatment coverage increases, there may be a rise in drug-resistant variants of the virus. The presented data indicate the need for genomic epidemiological surveillance, including an analysis of potential targets for medicinal products based on clinical observations. In the future, surveillance data may determine the treatment strategy and the need to develop new antivirals (RdRp and protease inhibitors) adjusted to resistant SARS-CoV-2 variants.

Keywords: drug resistance; COVID-19; SARS-CoV-2; antiviral therapy; mutations; remdesivir; paxlovid; 3CLpro; RdRp

For citation: Gasich E.L., Krotkova E.N., Kasko A.D., Bulda K.Yu., Krasko A.G., Dorofeeva E.A., Karpov I.A. The problem of SARS-CoV-2 virus resistance to direct-acting antivirals. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):415–427. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-569>

Funding. The study was carried out within the framework of the Translational Medicine State Research Programme (and the sub-programme Fundamental Aspects of Medical Science) as part of Assignment No. 1.29 to study the effect of resistance-conferring SARS-CoV-2 mutations on the course of the disease and the effectiveness of anti-COVID-19 treatment with regard to the current virus variants and to develop a molecular genetic testing algorithm to identify these mutations (R&D Registry No. 20230286).

Disclosure. E.L. Gasich has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2024. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемии и пандемии, вызванные возбудителями вирусных инфекций, являются одними из самых серьезных рисков для общественного здравоохранения. Ярким примером служит пандемия COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, которая унесла жизни около 7 млн человек (данные на 01.08.2024)¹. Первые случаи заболевания атипичной пневмонией были зарегистрированы в 2019 г. В качестве возбудителя был идентифицирован новый ранее неизвестный вирус, которому было присвоено название «коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2» (SARS-CoV-2), а вызываемое им заболевание – «коронавирусная болезнь 2019» (COVID-19) [1]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила 30 января 2020 г. вспышку коронавируса чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения, имеющей международное значение², а 11 марта 2020 г. – пандемией³.

Вирус SARS-CoV-2 претерпел значительные изменения за счет высокой скорости эволюции и преодоления межвидового барьера. Следовательно, с течением времени произошли изменения в генофонде популяции вируса. Об этом свидетельствует появление большого количества генетических вариантов, пять (альфа, бета, гамма, дельта, омикрон) из которых были классифицированы ВОЗ как варианты, вызывающие озабоченность⁴. В беспрецедентные сроки были разработаны и зарегистрированы вакцины против COVID-19 на основе как известных, так и новых биотехнологических платформ, и уже с 2021 г. началась всемирная кампания по массовой вакцинации [2]. Широкое применение

вакцин сыграло важную роль в предупреждении смертности и госпитализации в результате заражения SARS-CoV-2 [3].

В связи с пандемией и высокой летальностью при COVID-19 начались и продолжают до сих пор интенсивные исследования по поиску, разработке и применению эффективных противовирусных препаратов в отношении вируса SARS-CoV-2. До пандемии COVID-19 основное внимание исследователей и разработчиков уделялось вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирусу гепатита С (ВГС), на долю которых приходилось более 67% одобренных противовирусных препаратов [4]. Обычно период от открытия возбудителя до выпуска специфического в его отношении лекарственного препарата занимает длительное время. Впервые с применением трансляционных научных исследований удалось успешно провести кампанию по поиску лекарств среди применяющихся для лечения других возбудителей инфекционных заболеваний и разработке новых противовирусных препаратов в условиях быстро развивающейся пандемии [5].

При расширении масштабов эпидемии использование противовирусных препаратов для лечения коронавирусной инфекции может привести к новой проблеме, которая хорошо известна для таких вирусов, как вирус гепатита В, С, ВИЧ и вирус гриппа [6–9]. Это связано с естественной эволюцией вируса, в результате которой появляются нуклеотидные замены (мутации) в участках генома, кодирующих белки-мишени действия противовирусных препаратов. Как результат этих процессов – неэффективность терапии. В настоящее время

¹ <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=c>

² COVID-19 Public Health Emergency of International Concern (PHEIC) Global research and innovation forum. [https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-public-health-emergency-of-international-concern-\(pheic\)-global-research-and-innovation-forum](https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-public-health-emergency-of-international-concern-(pheic)-global-research-and-innovation-forum)

³ WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

⁴ <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>

для анализа резистентности, например, ВИЧ и ВГС, применяется в основном генотипирование, которое позволяет выявить мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью как в случае вирусологического неуспеха к применяемой схеме лечения, так и в случае передачи устойчивого варианта вируса при любом способе заражения. Риск увеличения уровня резистентности в вирусной популяции повышается за счет более широкого применения противовирусных препаратов, монотерапии, неадекватного дозирования, длительного применения у пациентов с иммуносупрессией [10]. Критерий эффективности терапии – достижение вирусологического ответа, определяемого как отсутствие вирусной РНК в назофарингеальных мазках.

В настоящее время из большого количества препаратов для профилактики и лечения COVID-19, проверенных в доклинических и клинических исследованиях, три (ремдесивир, молнупиравир и паксловид) были одобрены или получили разрешение на экстренное использование в разных странах⁵. Как и другие противовирусные препараты, используемые для лечения РНК-вирусных инфекций, они нацелены на определенные этапы жизненного цикла вируса SARS-CoV-2 за счет подавления функций неструктурных белков. Выделяют две основные группы препаратов, действие которых направлено на разные мишени и механизмы: ингибиторы вирусной протеазы и РНК-зависимой РНК-полимеразы [11, 12]. Поскольку геном SARS-CoV-2 характеризуется высокой частотой мутаций, особое беспокойство вызывает проблема резистентности вируса к имеющимся и разрабатываемым противовирусным препаратам.

Цель работы – проанализировать сведения о частоте встречаемости, спектре и причинах формирования мутаций лекарственной устойчивости вируса SARS-CoV-2 к ингибиторам основной протеазы и РНК-зависимой РНК-полимеразы, применяемым в клинической практике или находящимся в стадии разработки, на основе клинических, вирусологических и генотипических данных.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Характеристика вируса SARS-CoV-2

Новый коронавирус SARS-CoV-2 относится к роду *Betacoronavirus* и содержит одноцепочечную плюс-цепь РНК размером около 30000 пар оснований, окруженную нуклео-

капсидом и заключенную в фосфолипидную мембранную оболочку (рис. 1). Выход вируса из клетки осуществляется путем отпочковывания от мембраны клеток человека, поэтому по структуре оболочка вируса очень похожа на клеточную мембрану. Две трети вирусного генома кодируют два полипротеина, которые подвергаются протеолитическому процессингу с образованием 16 неструктурных белков (non-structural protein, nsp), тогда как оставшаяся область кодирует четыре структурных белка (спайковый, S; оболочечный, E; мембранный, M; нуклеокапсидный, N) и девять вспомогательных белков. В оболочку встроены структурные гликопротеины в форме шипов (белок S), которые обеспечивают присоединение и слияние с мембраной клетки-хозяина [13]. Белок S связывается с ферментом ангиотензин-превращающего фермента типа 2 (АПФ2), который присутствует на поверхности мембраны эпителиальных клеток хозяина. Белок E взаимодействует с белками M и N в ходе сборки вируса. Всего на целый вирион приходится несколько копий этого белка. Пентамеры белка способны формировать ионные каналы и представляют собой важный фактор вирулентности SARS-CoV-2. Белок M играет ключевую роль в сборке вируса. Также этот белок способен изменять участок мембраны клетки и захватывать другие структурные белки, обеспечивая их взаимодействие в месте сборки вирусной частицы [14].

Неструктурные белки SARS-CoV-2 участвуют во многих биологических процессах, включая репликацию вирусного генома, транскрипцию и протеолиз. Некоторые из них выполняют функции ферментов: РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp), основная цистеиновая 3С-подобная протеаза (3CLpro) и папаин-подобная протеаза (PLpro) [15]. РНК-зависимая РНК-полимераза ответственна за синтез вирусной РНК. Протеаза 3CLpro осуществляет процессинг полипротеинов, транслируемых с вирусной РНК, распознавая специфические сайты расщепления. Неструктурный белок nsp3, содержащий домен PLpro, ответственен за расщепление вирусного полипротеина в ходе вирусного процессинга. Кроме того, nsp3/PLpro также расщепляет модификации убиквитина и убиквитинподобный белок внутри клетки-хозяина, нарушая тем самым развитие реакций врожденного иммунитета [16].

Основу для эволюции вируса SARS-CoV-2 составляют два события – появление мутаций и процесс рекомбинации. Известно,

⁵ <https://www.bio.org/policy/human-health/vaccines-biodefense/coronavirus/pipeline-tracker>

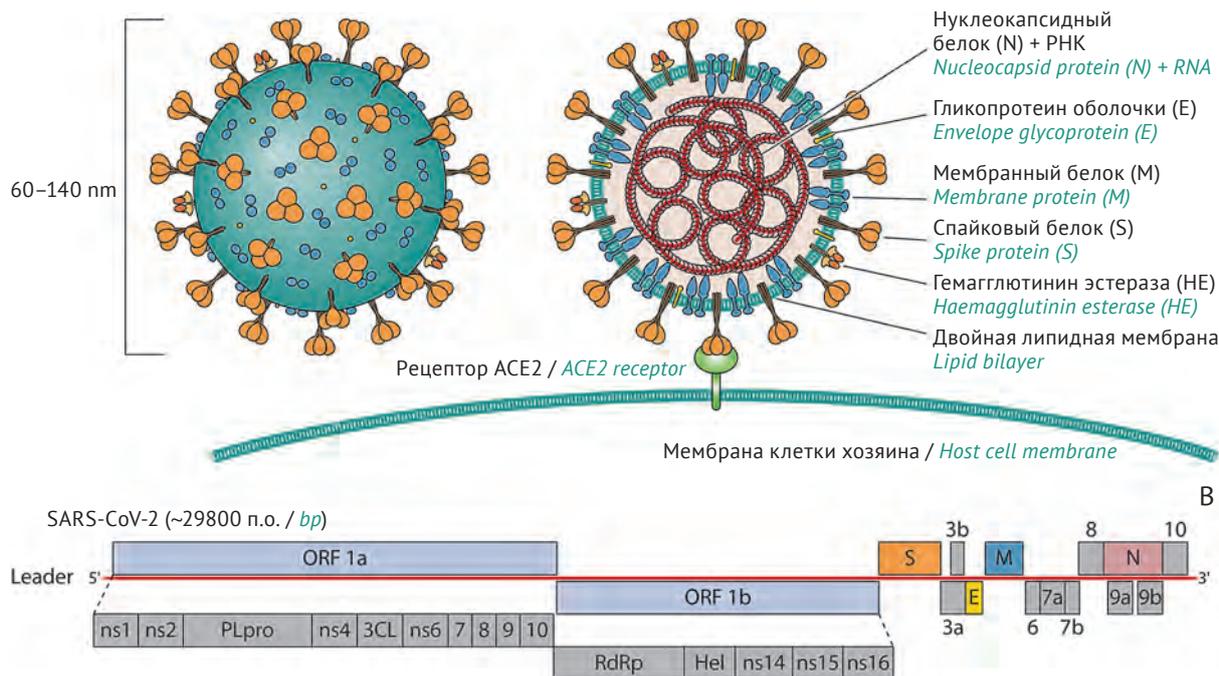


Рисунок подготовлен авторами по данным [15], лицензия CC BY / The figure is adapted from [15] under a CC BY licence

Рис. 1. Физическая и геномная структура SARS-CoV-2. А – схема вириона SARS-CoV-2; В – организация генома и белки с известными или неизвестными функциями.

Fig. 1. Physical and genome structure of SARS-CoV-2. A, SARS-CoV-2 virion diagram; B, genome organisation and proteins with known or unknown functions.

что частота и скорость появления мутаций для разных вирусов отличается. Так, для вируса гриппа H3N2 она составляет $1,35 \times 10^{-5}$, для ВИЧ – 14×10^{-5} [17, 18]. Скорость мутаций в геноме SARS-CoV-2 оценивается в 1×10^{-5} замен оснований в год [19]. Получены убедительные доказательства, что скорость эволюции вируса начала меняться с развитием пандемии COVID-19. Если в начале эпидемии средняя скорость эволюции генома SARS-CoV-2 варьировала в пределах от $1,78 \times 10^{-3}$ до $1,83 \times 10^{-3}$ замен оснований в год [20], то уже весной 2020 г. скорость эволюции SARS-CoV-2 составляла $4,1 \times 10^{-4}$ замен оснований [21]. Большинство мутаций и рекомбинаций в ходе эволюции остаются нейтральными, но часть из них дает возбудителю определенные преимущества: более эффективное заражение чувствительных клеток, появление новых путей проникновения вируса в клетку, устойчивость к иммунобиологическим агентам и терапевтическим препаратам (лекарственная устойчивость).

Основные мишени действия противовирусных препаратов

С начала пандемии для терапии COVID-19 применяются противовирусные препараты, действие которых направлено на блокирование синтеза ключевых белков вируса и подавление

его репликации [22]. Наиболее интенсивные исследования ведутся в направлении разработки ингибиторов RdRp и протеаз 3CLpro, которые играют ведущую роль в репродукции вируса SARS-CoV-2 и для которых определены кристаллические структуры, что позволяет осуществлять структурно-ориентированный дизайн лекарственных препаратов [23]. Мишени действия препаратов (РНК-зависимая РНК-полимераза и вирусные протеазы 3CLpro и PLpro) представлены на рисунке 2.

Ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы

Инициация репликации вируса и синтез субгеномных вирусных РНК с дальнейшим синтезом структурных и вспомогательных белков вируса начинается после трансляции кодируемой вирусом РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) с участием кофакторов nsp7 и nsp8 [25]. Известно, что фермент RdRp высоко консервативен у вирусов с плюс-цепью РНК-генома, у которых матрицей для синтеза белка служит непосредственно мРНК. Фармакологическое ингибирование активности RdRp возможно с помощью ряда соединений, относящихся к классу аналогов нуклеозидов. Они широко используются для терапии ВИЧ-инфекции и других возбудителей вирусных инфекционных заболеваний,

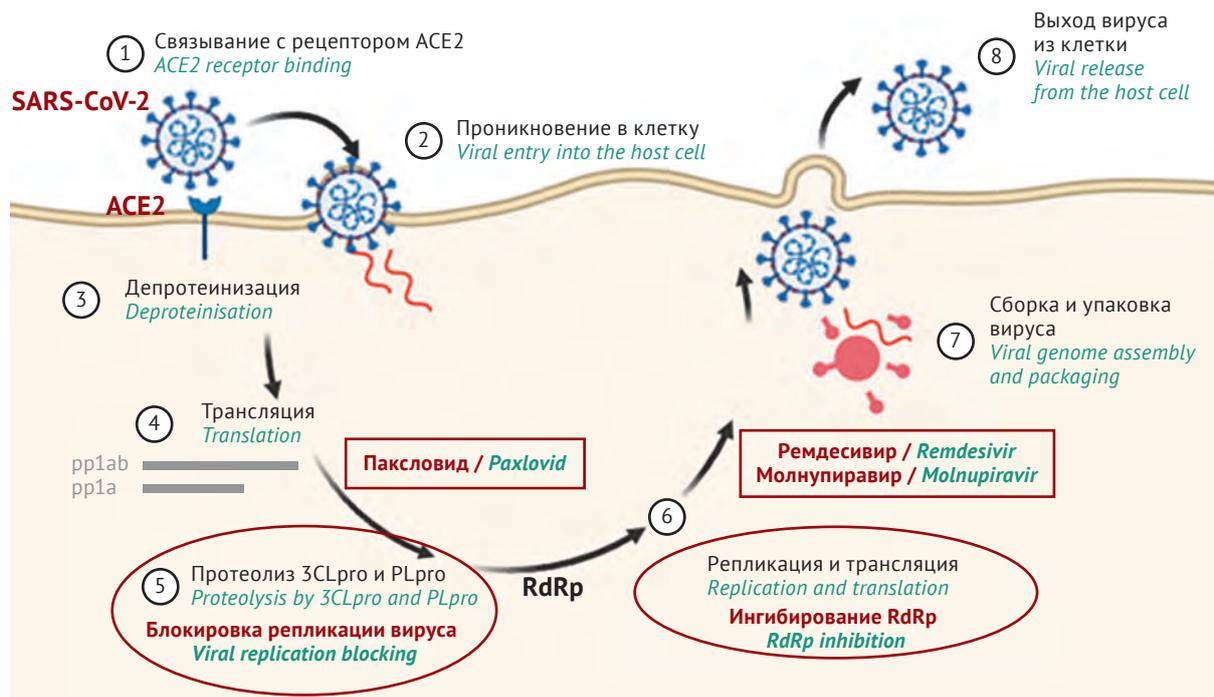


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Мишени действия препаратов на ключевых этапах жизненного цикла SARS-CoV-2, включая этапы: высвобождение вирусной РНК (депротеинизация, 3), трансляция вирусной РНК (4), протеолиз полипротеинов с участием 3CLpro и PLpro (5), репликация и трансляция (6), сборка и упаковка вирусных частиц (7), выход вириона из клетки (8).

Fig. 2. Targets for medicinal products at the key SARS-CoV-2 life cycle stages, including viral RNA release (deproteinisation (3)), viral RNA translation (4), proteolytic cleavage of polyproteins by 3CLpro and PLpro proteases (5), replication and translation (6), packaging and assembly of viral particles (7), and virion release from the host cell (8).

предотвращая репликацию вируса в зараженных клетках. К классу таких лекарственных средств относятся ремдесивир и молнупиравир [26]. Оба препарата подавляют репликацию вируса, но механизм их действия различен. Так, ремдесивир выступает в качестве аналога аденозинтрифосфата и встраивается в формирующиеся РНК-цепи с помощью фермента РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса. В результате происходит обрыв цепи во время репликации вирусной РНК [27]. Напротив, молнупиравир фосфорилируется в клетке с образованием фармакологически активного рибонуклеозид-трифосфата, который при встраивании в вирусную РНК приводит к накоплению ошибок в геноме вируса. Количество таких «неправильных» оснований увеличивается в течение нескольких циклов, приводя к подавлению репликации и гибели вируса⁶.

Ингибиторы протеаз

В процессе репликации SARS-CoV-2 синтезируются длинные полипептиды, которые в ходе процессинга нарезаются на составляющие вирусные белки с помощью двух протеаз:

основной протеазы (3CLpro) и PL-протеазы (PLpro) (рис. 2).

Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) был разрешен нирматрелвир в комбинации с ритонавиром для экстренного применения у лиц с высоким риском заражения SARS-CoV-2 под торговым названием «Паксловид» (Paxlovid, Pfizer) [11]. Нирматрелвир является ингибитором основной протеазы вируса (3CLpro), блокирующим активность фермента и останавливающим репликацию вируса. Паксловид также содержит низкие дозы ритонавира — ингибитора протеазы ВИЧ-1 и цитохрома P450 3A, действующего как фармакокинетический усилитель нирматрелвира [28].

Еще одним ингибитором 3CLpro, который недавно получил разрешение на экстренное использование в Японии, является S-217622 (энситрелвир, Хосова), нековалентный непептидный ингибитор, разработанный с помощью подходов вычислительной и медицинской химии. Энсирелвир и другие молекулы, находящиеся на различных стадиях разработки, вскоре могут

⁶ https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop-initial/questions-and-answers-refusal-marketing-authorisation-lagevriomolnupiravir_en.pdf

стать альтернативой паксловида и откроют возможности для комбинаторной терапии [28–30].

В настоящее время продолжается поиск ингибиторов белка *nsp3*, который содержит домен папаин-подобной протеазы (PLpro). Показано, что ингибирование PLpro значительно снижает вирусную нагрузку в модельном эксперименте с вирусом SARS-CoV-2. В настоящее время определены кристаллические структуры комплексов с тридцатью различными низкомолекулярными ингибиторами, показавшими свою эффективность в эксперименте. Это позволяет предположить, что PLpro является оптимальной мишенью для противовирусных препаратов следующего поколения [16].

Резистентность вируса SARS-CoV-2

Вирусы, подобные SARS-CoV-2, склонны к наследственной эволюции при адаптации к новым хозяевам под воздействием одной или нескольких мутаций. Это привело к появлению множества новых вариантов с характеристиками, отличными от предковых штаммов. Новые варианты эффективно распространялись в популяции, а применяемые ранее препараты, в первую очередь моноклональные антитела и иммуноглобулины, стали неэффективны⁷.

Значимость проблемы и риск отбора таких вариантов значительно повышаются у пациентов с ослабленным иммунитетом, которые склонны к длительному инфицированию ввиду сниженной способности организма подавлять репликацию вируса. Появились первые данные о выявлении мутаций резистентности SARS-CoV-2 у иммунокомпрометированных пациентов к ремдесивиру [31] и новому классу препаратов – паксловида⁸ [32, 33].

Адаптивные мутации в геноме вируса могут изменить его патогенный потенциал. Даже изменение одной аминокислоты может существенно нарушить способность вируса уклоняться от иммунной системы и усложнить разработку лекарственных средств против него. В последнее время значительно увеличилось количество исследований, посвященных изучению резистентности SARS-CoV-2 с применением генотипических и/или фенотипических методов, результаты которых указывают на актуальность данной проблемы [34, 35]. Результаты

генотипирования позволяют установить мутационный профиль вируса [36]. Фенотипический метод исследования дает возможность на культуре клеток Vero рассчитать концентрацию лекарственного средства, необходимую для подавления репликации SARS-CoV-2 на 50% (показатель IC_{50}), а также сравнить эффективность действия лекарственного средства на модели вируса дикого типа и при наличии мутаций в его геноме [37]. Мутации в зависимости от кратности изменения эффективности концентрации применяемого лекарственного средства, необходимого для подавления репликации вируса с резистентностью, подразделяются на несколько групп по уровню снижения восприимчивости вируса: сильные – более чем в 100 раз; умеренные – в 25–99 раз; средние – в 5–25 раз; слабые – в 5 раз и менее⁹.

В работе P.L. Tzou с соавт. [36] было предложено классифицировать мутационные изменения в участках 3CLpro и RdRp, как потенциальные мутации лекарственной устойчивости в случае, если они соответствовали одному из следующих трех критериев: связаны с 2,5-кратным или более высоким снижением чувствительности в биохимическом анализе или в культуре клеток; отобраны в ходе эксперимента при исследовании *in vitro*; обнаружены у пациентов, в схемы лечения которых включены ингибиторы 3CLpro или RdRp.

Мутации в геноме SARS-CoV-2, ассоциированные с резистентностью к ингибиторам РНК-зависимой РНК-полимеразы

В работе A. Szemiel с соавт. [37] в экспериментах *in vitro* с SARS-CoV-2 показано, что специфические мутационные изменения в *nsp12*, основной субъединице RdRp, влияют на эффективность ремдесивира. Значение показателя EC_{50} (полумаксимальная эффективная концентрация) увеличилось с 0,01 до 0,06 мкМ в случае наличия аминокислотных замен P480L или V557L в *nsp12*. В случае отсутствия ремдесивира продемонстрирована менее эффективная репликация этих изолятов и существенно более низкая жизнеспособность [37]. Еще 12 изолятов, культивируемых в клетках Vero в присутствии ремдесивира в концентрации 1 или 2,5 мкМ, обладали выраженным цитопатическим действием,

⁷ SARS-CoV-2 variant mutations conferring reduced susceptibility to antiviral drugs and monoclonal antibodies: a non-systematic literature review for surveillance purposes. ECDC; 2023. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/30781419-2a9a-11ee-839d-01aa75ed71a1/language-en>

⁸ Backman I. New class of drugs could prevent resistant COVID-19 variants. <https://medicine.yale.edu/news-article/new-class-of-drugs-could-prevent-resistant-covid-19-variants/>

⁹ SARS-CoV-2 variant mutations conferring reduced susceptibility to antiviral drugs and monoclonal antibodies: a non-systematic literature review for surveillance purposes. ECDC; 2023. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/30781419-2a9a-11ee-839d-01aa75ed71a1/language-en>

что свидетельствует об активной репликации вируса в клетке. Кроме того, еще два изолята реплицировались в присутствии ремдесивира в концентрации 7,5 мкМ. Выявлено четырехкратное увеличение показателя IC_{50} по сравнению с исходным штаммом. В условиях культивирования тех же вирусов без ремдесивира показатель IC_{50} оставался сопоставимым с родительским штаммом. Эти эксперименты *in vitro* указывают на появление специфических мутаций устойчивости к ремдесивиру в присутствии препарата.

В другом исследовании продемонстрировано снижение эффективности ремдесивира при замене глутамина на аспартат в позиции 802 (E802D, nsp12). Замены появлялись только в изолятах, пассируемых в присутствии ремдесивира, и отсутствовали в вирусах дикого типа [38]. Культивирование вируса в присутствии ремдесивира в концентрации 0,01 мкМ на протяжении 10 пассажей привело к появлению мутаций E796G и C799F (nsp12) и снижению эффективности действия препарата. Культивирование рекомбинантных вирусов с аминокислотными заменами в позициях E796G, C799F, E802D, D484Y, F480L и F480L/V557L (nsp12) в присутствии ремдесивира также оказало существенное влияние на эффективность препарата. Однако скорость заражения чувствительных клеток мутантными вирусами, устойчивыми к ремдесивиру, за исключением изолята с заменой D484Y, была значительно выше, чем у вируса дикого типа в присутствии ремдесивира. Такие мутантные варианты более эффективно инфицируют в присутствии ремдесивира новые чувствительные клетки по сравнению с вирусами дикого типа [39].

Опубликованы результаты и клинических наблюдений. Так, точечная мутация D484Y в пальцевом субдомене RdRp вируса была обнаружена у 76-летней женщины с В-клеточным иммунодефицитом и персистирующей вирусемией SARS-CoV-2 после 5-дневного курса лечения ремдесивиром [39].

Еще один случай развития резистентности описан у пациента с ослабленным иммунитетом и приобретенным В-клеточным иммунодефицитом, у которого развилось вялотекущее, затяжное течение COVID-19. Терапия ремдесивиром вызвала временный вирусологический ответ, но ее течение осложнилось возобновлением выделения вируса с высокой вирусной нагрузкой. Полногеномное секвенирование выявило мутацию E802D в РНК-зависимой РНК-полимеразе nsp12, которой не было в образцах, полученных

до начала лечения или в течение первых 5 сут терапии [31].

Новые мутации, обеспечивающие устойчивость к препаратам против SARS-CoV-2, имеют важные клинические последствия. Описаны первые случаи развития независимо приобретенной мутации в РНК-зависимой РНК-полимеразе *de novo* V792I в открытой рамке считывания, кодирующей nsp12, у двух реципиентов почечного трансплантата после воздействия ремдесивира [40]. Также было показано, что замена V792I быстро формировалась *in vitro* в присутствии возрастающих концентраций ремдесивира и приводила к увеличению IC_{50} ремдесивира в 2,6 раза [41]. Представленные данные подчеркивают необходимость дополнительных усилий по выявлению мутаций резистентности и устранению их клинических последствий в группах компрометированных пациентов.

Мутации в геноме SARS-CoV-2, ассоциированные с резистентностью к ингибиторам основной протеазы

Разработка ингибитора основной протеазы (паксловид) — большое достижение в лечении COVID-19, поскольку его можно принимать перорально. Однако одним из важных остается вопрос лекарственной резистентности SARS-CoV-2 к применяемым или разрабатываемым препаратам.

Появление вариантов SARS-CoV-2 с мутационными изменениями в области 3CLpro вызвало озабоченность по поводу потенциальной лекарственной устойчивости. Так, в работе У. Ну с соавт. [43] было идентифицировано 100 встречающихся в природе мутаций 3CLpro, расположенных в сайте связывания нирматрелвира, среди которых 20 аминокислотных замен, включая S144M/F/A/G/Y, M165T, E166G, H172Q/F и Q192T/S/L/A/I/P/H/V/W/C/F, оказывают прямое влияние на устойчивость к нирматрелвиру (>10-кратное увеличение), который входит в состав лекарственного средства паксловид.

Исследования *in vitro*, выполненные компанией Pfizer, показали, что у нирматрелвир-селектированных вирусов SARS-CoV-2 имеется как единичная замена S144A, так и замены в следующих комбинациях: T21I+S144A и T21I+S144A+T304I¹⁰. Аминокислотная замена H172Y определена как мутация, вызывающая наибольшее снижение активности нирматрелвира, с 233-кратным увеличением значения константы диссоциации¹¹. Однако, учитывая пониженную ферментативную активность вируса с мутацией H172Y

¹⁰ Fact sheet for healthcare providers: emergency use authorization for PAXLOVID™. <https://www.fda.gov/media/155050/download>

¹¹ Там же.

по сравнению с вирусом дикого типа и повышенную ферментативную активность вируса с мутацией Q189E, было предположено, что двойной мутант H172Y+Q189E может восстановить сниженную ферментативную активность лекарственно-устойчивого мутанта H172Y. Показано, что двойная мутация H172Y+Q189E приводила как к повышению ферментативной активности, так и к устойчивости к нирматрелвиру [43].

Несколько мутаций Y54C, G138S, L167F, Q192R и A194S были выявлены в эксперименте *in vitro* как обеспечивающие резистентность к ингибиторам протеазы – 3CLpro (нирматрелвиру), при этом сочетание аминокислотных замен Y54C и L167F в комбинации с P132H в генной сигнатуре варианта омикрон повышает устойчивость к ингибиторам протеазы, что подчеркивает их потенциальную значимость [42]. Необходимо отметить, что замены в позиции 132 (P132L/S) были выявлены также в вирусных изолятах, полученных от четырех пациентов, получавших лечение препаратом паксловид¹².

В исследовании, выполненном Y. Zhou с соавт. [44], установлена сочетанная двойная мутация L50F+E166V, которая приводила к 80-кратному снижению чувствительности к нирматрелвиру. В другом исследовании было показано, что мутация E166V помимо 100-кратного увеличения IC₅₀ нирматрелвира, также обеспечивала перекрестную устойчивость к энсиртрелвиру [45]. Кроме того, мутации L50F и E166V были выявлены в вирусных изолятах от нескольких лиц у людей, получавших лечение препаратом паксловид¹³. В совокупности все описанные выше данные указывают на то, что мутация E166V обеспечивает устойчивость к препаратам-ингибиторам основной протеазы.

Степень снижения чувствительности SARS-CoV-2 к противовирусным препаратам различна и зависит от конкретных изменений в молекулярных мишенях препаратов. Например, по имеющимся опубликованным данным, с появлением замены S861G в белке nsp12 снижается чувствительность вируса к ремдесивиру в 25–99 раз (табл. 1). При использовании паксловид (нирматрелвир/ритонавир) спектр таких мутаций значительно шире. Так, мутации, обнаруженные в ORF1ab (nsp5:S144A, nsp5:Q189K, nsp5:H172Y, nsp5:E166A и nsp5:F140A) приводят к умеренному или высокому снижению чувствительности к паксловиду (нирматрелвир/ритонавир).

Важно отметить и тот факт, что многие варианты вируса с мутациями, влияющими на эффективность применения лекарственных

препаратов, существовали до их применения, что было доказано методом филогенетического анализа [33]. Следовательно, эти варианты вируса попадают в человеческую популяцию и способны к дальнейшему распространению.

В целом на данном этапе представленность мутаций резистентности невелика в популяции вируса SARS-CoV-2. Например, исследование 13446588 полногеномных последовательностей вируса SARS-CoV-2, депонированных в общедоступных базах данных до июня 2022 г., показало, что мутации устойчивости к ингибитору 3CLpro остаются редкими и наблюдаются в основном спорадические случаи на протяжении года после начала применения паксловид. Лишь 0,5% проанализированных последовательностей (n=67095) имели такие мутации [34].

Наиболее уязвимой группой являются пациенты с иммуносупрессией. Например, выявлен случай развития лекарственной резистентности у 65-летнего мужчины со злокачественными новообразованиями в анамнезе. У данного пациента, инфицированного SARS-CoV-2, на протяжении 190 сут от момента первичного выявления антигена и РНК вируса проводилось количественное определение уровней антигена и вирусной нагрузки в назофарингеальных мазках. Было также выполнено полногеномное секвенирование вируса для изучения механизмов лекарственной устойчивости. На протяжении всего периода наблюдения пациенту проводили терапию несколькими противовирусными препаратами и антителами, включая сотровимаб, ремдесивир, паксловид (нирматрелвир/ритонавир) и молнупиравир. Первоначально уровни вирусного антигена снизились после лечения. Однако после того, как повторно появились маркеры вируса в мазках (антиген и РНК), у пациента не наблюдалось вирусологического ответа. Анализ вирусного генома выявил единственный субвариант омикрона (BA.1.1), который эволюционировал в организме хозяина в ходе прогрессирования заболевания. Вирус приобрел множественные мутации устойчивости к нирматрелвиру (3CLpro – E166 A/V), сотровимабу (S-белок – P337L и E340K) и ремдесивиру (RdRp – V166L). Благодаря мутациям SARS-CoV-2 получил преимущество в репликации по сравнению с дикими штаммами в присутствии лекарственных препаратов, и такой вид лекарственной устойчивости можно отнести к приобретенной [33].

Таким образом, в отношении COVID-19 современные противовирусные препараты показали

¹² Там же.

¹³ Там же.

Таблица 1. Мутации ORF1ab вируса SARS-CoV-2, определяющие резистентность к ремдесивиру и паксловиду, и их распространенность в мире и в странах Европейского союза

Table 1. SARS-CoV-2 ORF1ab mutations conferring resistance to remdesivir and paxlovid and the prevalence of these mutations in the world and in the European Union

Мутации ORF1ab <i>ORF1ab mutations</i>		Противовирусные препараты* <i>Antivirals*</i>		Частота распространенности в мире, % <i>Prevalence in the world, %</i>	Частота распространенности в странах Европейского союза, % <i>Prevalence in the European Union, %</i>
Участки <i>Sites</i>	Позиции <i>Positions</i>	Ремдесивир <i>Remdesivir</i>	Паксловид <i>Paxlovid</i>		
nsp5	G15S	–	4,4	0,2	0,13
	Y54A	–	23,6	0	0
	T135S	–	3,5	0	0
	F140A	–	39	0	0
	S144A	–	91,9	0	0
	H164N	–	6,4	0,03	0
	E166A	10,4	33,4	0	0
	H172Y	–	233	0	0
	Q189K	–	65,4	0	0
	D248E	–	3,7	0	0
nsp12	V166A	–	–	0,01	0,01
	N198S	10,4	–	0,01	0
	F480L	3,8	–	0	0
	D484Y	3,1	–	0	0
	V557L	5,7	–	0	0
	V792I	8	–	0	0
	E796G	2,6	–	0	0
	C799F	11,5	–	0	0
	C799R	2,7	–	0	0
	E802D	7,3	–	0	0
	E802A	3,9	–	0	0
	S861G	29,7	–	0	0
	S861A	2,8	–	0	0

Таблица подготовлена авторами по материалам Европейского центра по профилактике и контролю заболеваний¹⁴ / The table is adapted by the authors from the materials of the European Centre for Disease Prevention and Control¹⁴

Примечание. * – цвет ячеек столбца указывает на уровень снижения восприимчивости вируса к препаратам: красный цвет – в более чем в 100 раз; оранжевый – в 25–99 раз; розовый – в 5–25 раз, зеленый – в 5 раз и менее. «–» – отсутствие данных.
*Note.** Cell colours indicate the extent of reduction in susceptibility to antiviral treatment: red, ≥100-fold reduction; orange, 25–99-fold reduction; yellow, 5–25-fold reduction; green, <5-fold reduction; and dashes (–) indicate the absence of data.

клиническую эффективность. В ближайшее время, вероятно, не стоит ожидать значительного увеличения уровня резистентности вируса и повышения необходимости выполнения анализа на генотипическую резистентность до начала лечения пациентов. Но существует и ряд причин, по которым следует продолжать мониторинг

резистентности к ингибиторам 3CLpro и RdRp. Во-первых, наиболее частая мутация G15S (встречаемость – 0,2% в мире и 0,13% в странах Европейского союза) доминирует в отдельных генетических вариантах. Это позволяет предположить, что эти мутации не влияют на приспособляемость вируса и могут эффективно

¹⁴ SARS-CoV-2 variant mutations conferring reduced susceptibility to antiviral drugs and monoclonal antibodies: a non-systematic literature review for surveillance purposes. ECDC; 2023. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/30781419-2a9a-11ee-839d-01aa75ed71a1/language-en>

передаваться. Следует иметь в виду, что G15S присутствовала в последовательностях вируса до начала клинического использования паксловида, что свидетельствует о спонтанном возникновении мутации, а не отборе при использовании данного препарата. Несмотря на высокое селективное давление, эта мутация может распространяться в популяции [46]. Во-вторых, низкая распространенность мутаций связана и с достаточно ограниченным использованием паксловида и ремдесивира. Нельзя исключить вероятность того, что с увеличением использования противовирусных препаратов в будущем может произойти отбор лекарственно-устойчивых штаммов, особенно если препараты будут применяться в виде монотерапии [47]. В-третьих, резистентность к противовирусным препаратам может возникнуть внезапно. Например, в 2008 г. при лечении сезонного гриппа А (H1N1) произошел значительный всплеск устойчивости к осельтамивиру: с <10% в сезоне 2006–2007 гг. до почти 100% в сезоне 2008–2009 гг., хотя препарат был впервые представлен в конце 1990-х гг. [48]. В-четвертых, важным фактором являются пациенты с иммуносупрессией, у которых SARS-CoV-2 может сохраняться в течение многих месяцев, и противовирусный препарат может потерять свою эффективность по мере отбора или появления спонтанных мутаций, создавая риск распространения лекарственно-устойчивых штаммов и/или неблагоприятного исхода для самого пациента [49].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного анализа свидетельствуют о рисках развития устойчивых форм

SARS-CoV-2 к применяемым в настоящее время противовирусным препаратам, среди которых ингибиторы RdRp (ремдесивир и молнупиравир) и протеазы 3CLpro (паксловид). Несмотря на то что частота встречаемости мутаций лекарственной устойчивости к ремдесивиру, молнупиравиру и паксловиду в геноме вируса в мире и в европейском регионе остается на достаточно низком уровне, необходимо принимать во внимание факт небольшого опыта их применения. Поэтому по мере увеличения охвата лечением пациентов с COVID-19 с учетом фактора высокой генетической изменчивости вируса SARS-CoV-2 может произойти рост его резистентных вариантов. Вполне возможно, это потребует разработки принципиально новых противовирусных лекарственных средств и/или использования комбинации препаратов в случае выявления мультирезистентных вариантов SARS-CoV-2.

Так как основные публикации о случаях резистентности в клинической практике касаются преимущественно групп пациентов с иммуносупрессией, на современном этапе в надзоре за резистентностью возбудителя COVID-19 особое внимание должно быть уделено лицам с ослабленным иммунитетом.

В целом представленные данные открывают новые перспективы в наблюдении за эволюцией SARS-CoV-2 и свидетельствуют о необходимости проведения геномного эпидемиологического надзора с анализом потенциальных мишеней действия лекарственных препаратов против SARS-CoV-2 и данных клинического наблюдения пациентов, что может иметь важное значение для выбора тактики лечения COVID-19.

Литература/References

1. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
2. Li Y, Tenchov R, Smoot J, Liu C, Watkins S, Zhou Q. A comprehensive review of the global efforts on COVID-19 vaccine development. *ACS Cent Sci*. 2021;7(4):512–33. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00120>
3. Rahmani K, Shavaleh R, Forouhi M, Disfani HF, Kamandi M, Oskooi RK, et al. The effectiveness of COVID-19 vaccines in reducing the incidence, hospitalization, and mortality from COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Front Public Health*. 2022;10:873596. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.873596>
4. Chaudhuri S, Symons JA, Deval J. Innovation and trends in the development and approval of antiviral medicines: 1987–2017 and beyond. *Antiviral Res*. 2018;155:76–88. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.05.005>
5. Padmanabha Das KM. Antiviral drug discovery against pathogens of pandemic concern: advancements in target site identification and structure-based drug development. *Front Mol Biosci*. 2023;10:1165208. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1165208>
6. Alkhamis MA, Moore BR, Perez AM. Phylodynamics of H5N1 highly pathogenic avian influenza in Europe, 2005–2010: potential for molecular surveillance of new outbreaks. *Viruses*. 2015;7(6):3310–28. <https://doi.org/10.3390/v7062773>
7. Ghany MG, Doo EC. Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology*. 2009;49(5 Suppl):S174–84. <https://doi.org/10.1002/hep.22900>
8. Wensing AM, Calvez V, Ceccherini-Silberstein F, Charpentier C, Günthard HF, Paredes R, et al. 2022 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med*. 2022;30(4):559–74. PMID: 36375130
9. Mushtaq S, Hashmi AH, Khan A, Asad Raza Kazmi SM, Manzoor S. Emergence and persistence of resistance-associated substitutions in HCV GT3 patients failing direct-acting antivirals. *Front Pharmacol*. 2022;13:894460. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.894460>
10. Nande A, Hill AL. The risk of drug resistance during long-acting antimicrobial therapy. *Proc Biol Sci*. 2022;289(1986):20221444. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.1444>
11. Malin JJ, Suárez I, Priesner V, Fätkenheuer G, Rybniker J. Remdesivir against COVID-19 and other viral diseases. *Clin*

- Microbiol Rev.* 2020;34(1):e00162-20.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00162-20>
12. Hashemian SMR, Sheida A, Taghizadieh M, Memar MY, Hamblin MR, Bannazadeh Baghi H, et al. Paxlovid (nirmatrelvir/ritonavir): a new approach to Covid-19 therapy? *Biomed Pharmacother.* 2023;162:114367.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114367>
 13. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:587269.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>
 14. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(10):165878.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>
 15. Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B, et al. Tools and techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/ COVID-19 detection. *Clin Microbiol Rev.* 2021;34(3):e00228-20.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00228-20>
 16. Calleja DJ, Lessene G, Komander D. Inhibitors of SARS-CoV-2 PLpro. *Front Chem.* 2022;10:876212.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2022.876212>
 17. Herlocher ML, Elias S, Truscon R, Harrison S, Mindell D, Simon C, Monto AS. Ferrets as a transmission model for influenza: sequence changes in HA1 of type A (H3N2) virus. *J Infect Dis.* 2001;184(5):542–6.
<https://doi.org/10.1086/322801>
 18. Mansky LM. Forward mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 in a T-lymphoid cell line. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1996;12(4):307–14.
<https://doi.org/10.1089/aid.1996.12.307>
 19. Van Egeren D, Novokhodko A, Stoddard M, Tran U, Zetter B, Rogers M, et al. Risk of rapid evolutionary escape from biomedical interventions targeting SARS-CoV-2 spike protein. *PLoS One.* 2021;16(4):e0250780.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250780>
 20. Li X, Wang W, Zhao X, Zai J, Zhao Q, Li Y, Chaillon A. Transmission dynamics and evolutionary history of 2019-nCoV. *J Med Virol.* 2020;92(5):501–11.
<https://doi.org/10.1002/jmv.25701>
 21. Motayo BO, Oluwasemowo OO, Oluosola BA, Akinduti PA, Arega OT, Obafemi YD, et al. Evolution and genetic diversity of SARS-CoV-2 in Africa using whole genome sequences. *Int J Infect Dis.* 2021;103:282–7.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.11.190>
 22. Rahmah L, Abarikwu SO, Arero AG, Essouma M, Jibril AT, Fal A, et al. Oral antiviral treatments for COVID-19: opportunities and challenges. *Pharmacol Rep.* 2022;74(6):1255–78.
<https://doi.org/10.1007/s43440-022-00388-7>
 23. Duan X, Lacko LA, Chen S. Druggable targets and therapeutic development for COVID-19. *Front Chem.* 2022;10:963701.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2022.963701>
 24. Su H, Xu Y, Jiang H. Drug discovery and development targeting the life cycle of SARS-CoV-2. *Fundamental Res.* 2021;1(2):151–65.
<https://doi.org/10.1016/j.fmre.2021.01.013>
 25. Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: molecular and structural insights. *J Basic Microbiol.* 2021;61(3):180–202.
<https://doi.org/10.1002/jobm.202000537>
 26. Vangeel L, Chiu W, De Jonghe S, Maes P, Slechten B, Raymenants J, et al. Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. *Antiviral Res.* 2022;198:105252.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105252>
 27. Gordon CJ, Tchesnokov EP, Feng JY, Porter DP, Götte M. The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Biol Chem.* 2020;295(15):4773–9.
<https://doi.org/10.1074/jbc.AC120.013056>
 28. Shimizu R, Sonoyama T, Fukuhara T, Kuwata A, Matsuzaki T, Matsuo Y, Kubota R. Evaluation of the drug–drug interaction potential of ensitrelvir fumaric acid with cytochrome P450 3A substrates in healthy Japanese adults. *Clin Drug Investig.* 2023;43(5):335–46.
<https://doi.org/10.1007/s40261-023-01265-8>
 29. Unoh Y, Uehara S, Nakahara K, Nobori H, Yamatsu Y, Yamamoto S, et al. Discovery of S-217622, a noncovalent oral SARS-CoV-2 3CL protease inhibitor clinical candidate for treating COVID-19. *J Med Chem.* 2022;65(9):6499–512.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00117>
 30. Bege M, Borbás A. The design, synthesis and mechanism of action of paxlovid, a protease inhibitor drug combination for the treatment of COVID-19. *Pharmaceutics.* 2024;16(2):217.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020217>
 31. Gandhi S, Klein J, Robertson A, Peña-Hernández MA, Lin MJ, Roychoudhury P, et al. De novo emergence of a remdesivir resistance mutation during treatment of persistent SARS-CoV-2 infection in an immunocompromised patient: a case report. *Nat Commun.* 2022;13(1):1547.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-29104-y>
 32. Moghadasi SA, Heilmann E, Khalil AM, Nnabuife C, Kearns FL, Ye C, et al. Transmissible SARS-CoV-2 variants with resistance to clinical protease inhibitors. *Sci Adv.* 2023;9(13):eade8778.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.ade8778>
 33. Hirotsu Y, Kobayashi H, Kakizaki Y, Saito A, Tsutsui T, Kawaguchi M, et al. Multidrug-resistant mutations to antiviral and antibody therapy in an immunocompromised patient infected with SARS-CoV-2. *Med.* 2023;4(11):813–824.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.medj.2023.08.001>
 34. Ip JD, Wing-Ho Chu A, Chan WM, Cheuk-Ying Leung R, Umer Abdullah SM, Sun Y, Kai-Wang To K. Global prevalence of SARS-CoV-2 3CL protease mutations associated with nirmatrelvir or ensitrelvir resistance. *EBioMedicine.* 2023;91:104559.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104559>
 35. Vitiello A. Sars-Cov-2 and risk of antiviral drug resistance. *Ir J Med Sci.* 2022;191(5):2367–8.
<https://doi.org/10.1007/s11845-021-02820-y>
 36. Tzou PL, Tao K, Sahoo MK, Kosakovsky Pond SL, Pinsky BA, Shafer RW. Sierra SARS-CoV-2 sequence and antiviral resistance analysis program. *J Clin Virol.* 2022;157:105323.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105323>
 37. Szemiel AM, Merits A, Orton RJ, MacLean O, Wickenhagen A, Lieber G, et al. In vitro evolution of remdesivir resistance reveals genome plasticity of SARS-CoV-2. *Preprint-Biorxiv.* 2021;ID:ppbiorxiv-429199
<https://doi.org/10.1101/2021.02.01.429199>
 38. Checkmahomed L, Carbonneau J, Du Pont V, Riola NC, Perry JK, Li J, et al. In vitro selection of remdesivir-resistant SARS-CoV-2 demonstrates high barrier to resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022;66(7):e0019822.
<https://doi.org/10.1128/aac.00198-22>
 39. Martinot M, Jary A, Fafi-Kremer S, Leducq V, Delagreviere H, Garnier M, et al. Emerging RNA-dependent RNA polymerase mutation in a remdesivir-treated B-cell immunodeficient patient with protracted coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2021;73(7):e1762–5.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1474>
 40. Hogan JJ, Duerr R, Dimartino D, Marier C, Hochman S, Mehta S, et al. Remdesivir resistance in transplant recipients with persistent COVID-19. *Clin Infect Dis.* 2023;76(2):342–5.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciac769>
 41. Stevens LJ, Pruijssers AJ, Lee HW, Gordon CJ, Tchesnokov EP, Gribble J, et al. Mutations in the SARS-CoV-2 RNA-depend

- dent RNA polymerase confer resistance to remdesivir by distinct mechanisms. *Sci Transl Med.* 2022;14(656):eabo0718. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo0718>
42. Heilmann E, Costacurta F, Moghadasi SA, Ye C, Pavan M, Bassani D et al. SARS-CoV-2 3CL^{pro} mutations selected in a VSV-based system confer resistance to nirmatrelvir, ensitrelvir, and GC376. *Sci Transl Med.* 2023;15(678):eabq7360. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abq7360>
43. Hu Y, Lewandowski EM, Tan H, Zhang X, Morgan RT, Zhang X, et al. Naturally occurring mutations of SARS-CoV-2 main protease confer drug resistance to nirmatrelvir. *ACS Cent Sci.* 2023;9(8):1658–69. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00538>
44. Zhou Y, Gammeltoft KA, Ryberg LA, Pham LV, Tjørnelund HD, Binderup A, et al. Nirmatrelvir-resistant SARS-CoV-2 variants with high fitness in an infectious cell culture system. *Sci Adv.* 2022;8(51):eadd7197. <https://doi.org/10.1126/sciadv.add7197>
45. Iketani S, Mohri H, Culbertson B, Hong SJ, Duan Y, Luck MI, et al. Multiple pathways for SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir. *Nature.* 2023;613(7944):558–64. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05514-2>
46. Sjaarda CP, Lau L, Simpson JT, Fattouh R, Biondi MJ, Maguire F, et al. Prevalence of low-frequency, antiviral resistance variants in SARS-CoV-2 isolates in Ontario, Canada, 2020–2023. *JAMA Netw Open.* 2023;6(7):e2324963. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.24963>
47. Kozlov M. COVID drug Paxlovid was hailed as a game-changer. What happened? *Nature.* 2023;613(7943):224–5. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-04576-6>
48. Weinstock DM, Zuccotti G. The evolution of influenza resistance and treatment. *JAMA.* 2009;301(10):1066–9. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.324>
49. Guilbaud R, Franco Yusti AM, Leducq V, Zafilaza K, Bridier-Nahmias A, Todesco E, et al. Higher levels of SARS-CoV-2 genetic variation in immunocompromised patients: a retrospective case-control study. *J Infect Dis.* 2023;jiad499. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad499>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.Л. Гасич** – разработка дизайна статьи, написание, редактирование и критическое обсуждение текста рукописи; **Е.Н. Кроткова** – разработка дизайна статьи и критическое обсуждение текста рукописи, **А.Д. Коско** – анализ данных литературы, написание текста рукописи; **К.Ю. Булда** – анализ данных литературы, оформление рукописи, работа с иллюстративным материалом, **А.Г. Красько** – разработка дизайна статьи, критическое обсуждение текста рукописи; **Е.А. Дорофеева** – анализ данных литературы; **И.А. Карпов** – редактирование и переработка текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.L. Gasich** designed the study; drafted, edited, and critically discussed the manuscript. **E.N. Krotkova** designed the study and critically discussed the manuscript. **A.D. Kasko** analysed literature data and drafted the manuscript. **K.Yu. Bulda** analysed literature data, drafted the manuscript, and worked with the illustrative material. **A.G. Krasko** designed the study and critically discussed the manuscript. **E.A. Dorofeeva** analysed literature data. **I.A. Karpov** edited and revised the manuscript.

Об авторах / Authors

Гасич Елена Леонидовна, д-р биол. наук, доц. / **Elena L. Gasich**, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3662-3045>

Кроткова Елена Николаевна, канд. мед. наук, доц. / **Elena N. Krotkova**, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9006-0917>

Коско Анастасия Дмитриевна / **Anastasiya D. Kasko**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-4237-5893>

Булда Кирилл Юрьевич / **Kirill Yu. Bulda**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-4179-3125>

Красько Анатолий Геннадиевич, канд. мед. наук / **Anatoli G. Krasko**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2765-3525>

Дорофеева Елизавета Алексеевна / **Elizaveta A. Dorofeeva**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-7488-6401>

Карпов Игорь Александрович, д-р мед. наук, проф., член-корр. Национальной академии наук Республики Беларусь / **Igor A. Karpov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5816-2166>

Поступила 01.04.2024

После доработки 07.08.2024

Принята к публикации 12.09.2024

Online first 02.10.2024

Received 1 April 2024

Revised 7 August 2024

Accepted 12 September 2024

Online first 2 October 2024



Лекарственные препараты клеточной терапии: современное состояние исследований

Е.В. Галицына , Е.А. Куликова, Ю.А. Павельев, О.С. Кузнецова, А.С. Сенина,
А.Б. Гусев

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Добролюбова, д. 11, Москва,
127254, Российская Федерация

 Галицына Елена Валерьевна; galitsynaev@mednet.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Препараты клеточной терапии и тканевой инженерии ориентированы на пациентов с тяжелыми заболеваниями (генетические, нейродегенеративные, онкологические заболевания, травмы опорно-двигательного аппарата, ожоги и др.), при которых существует немного альтернативных вариантов лечения. Анализ данных о клинической эффективности препаратов этой группы важен для понимания перспектив развития данной области как одного из направлений персонализированной медицины.

ЦЕЛЬ. Обзор основных направлений клеточной терапии, анализ данных об одобренных лекарственных препаратах клеточной терапии и тканевой инженерии, оценка проблем и перспектив их использования.

ОБСУЖДЕНИЕ. Проведен анализ данных о составе препаратов клеточной терапии и тканевой инженерии, показаниях к применению, результатах клинических исследований. Клеточные продукты изготавливают на основе аутологичных или аллогенных мезенхимальных и лимбальных стволовых клеток, эпителиальных клеток, хондроцитов, нативных или генетически модифицированных гемопоэтических стволовых клеток, генетически модифицированных лимфоцитов (CAR-T, CAR-NK) и др. Препараты на основе клеточных технологий получили одобрение во многих странах: США (около 30), странах Европейского союза (около 20), Японии (18), Южной Корее (15) и др. В Российской Федерации зарегистрировано два препарата на основе клеток – один на основе CAR-T-лимфоцитов (генотерапевтический препарат), другой на основе хондроцитов (биомедицинский клеточный продукт) – при этом последний является российской разработкой. Основными преимуществами препаратов клеточной терапии по сравнению со стандартными методами лечения являются их более высокая эффективность и меньшее количество вызываемых побочных эффектов. К проблемным аспектам клеточной терапии можно отнести риск формирования иммунных реакций, а также вероятность мутагенеза при использовании лентивирусных векторов или технологии CRISPR/Cas9; ограниченная эффективность CAR-T и CAR-NK клеток под иммуносупрессивным влиянием опухолевого микроокружения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Подходы к лечению с использованием препаратов клеточной терапии и тканевой инженерии позволяют эффективно восполнить дефекты различных тканей организма, избежать высокоинвазивных хирургических вмешательств и значительно сократить сроки регенерации по сравнению со стандартными методами терапии. Создание аналогичных доступных российских препаратов является перспективной задачей для системы здравоохранения Российской Федерации.

Ключевые слова: клеточная терапия; препараты клеточной терапии; препараты тканевой инженерии; генотерапевтические лекарственные препараты; высокотехнологичные лекарственные препараты; мезенхимальные стволовые клетки; лимбальные стволовые клетки; гемопоэтические стволовые клетки; CAR-T терапия; CAR-NK терапия; клинические исследования

© Е.В. Галицына, Е.А. Куликова, Ю.А. Павельев, О.С. Кузнецова, А.С. Сенина, А.Б. Гусев, 2024

Для цитирования: Галицына Е.В., Куликова Е.А., Павельев Ю.А., Кузнецова О.С., Сенина А.С., Гусев А.Б. Лекарственные препараты клеточной терапии: современное состояние исследований. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(4):428–442. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-557>

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Минздрава России, направленной на обеспечение деятельности координационного центра исследований и разработок в области медицинской науки ФГБУ «ЦНИИОИЗ» Минздрава России в рамках реализации федерального проекта «Медицинская наука для человека».

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Cell-based medicinal products: a review of current research

Elena V. Galitsyna✉, Ekaterina A. Kulikova, Yuriy A. Pavelyev, Olga S. Kuznetsova,
Anna S. Senina, Alexander B. Gusev

Russian Research Institute of Health, 11 Dobrolyubov St., Moscow 127254, Russian Federation

✉ Elena V. Galitsyna; galitsynaev@mednet.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Cell therapies and tissue-engineered products are aimed at patients with severe conditions (genetic and neurodegenerative disorders, cancers, musculoskeletal injuries, burns, etc.) that lack alternative treatment options. Analysis of clinical efficacy data on cell-based medicinal products is important for understanding their translational potential in personalised medicine.

AIM. This study aimed to review key trends in cell therapy, analyse data on approved cell therapies and tissue-engineered products, and assess challenges and prospects for their use.

DISCUSSION. This article analyses data on the composition of cell therapies and tissue-engineered products, indications for their use, and the results of clinical studies. Cell-based medicinal products are derived from autologous or allogeneic mesenchymal and limbal stem cells, epithelial cells, chondrocytes, native or genetically engineered haematopoietic stem cells, genetically engineered lymphocytes (CAR-T, CAR-NK), etc. Medicinal products based on cell technologies have been approved in many countries, including the USA (approximately 30), the European Union (approximately 20), Japan (18), South Korea (15), etc. As of today, two cell therapies have been granted marketing authorisation in the Russian Federation. The first is based on CAR-T cells (a gene therapy product), and the other is based on chondrocytes (a cell-based medicinal product); the latter has been developed in Russia. The main advantages of cell therapy products include higher efficacy and fewer adverse drug reactions in comparison with standard treatment modalities. The main challenges of cell therapy include the risks of immune reactions and mutagenesis associated with lentiviral vectors or CRISPR/Cas9 technology, as well as limited efficacy of CAR-T and CAR-NK cells due to immunosuppressive properties of tumour microenvironment.

CONCLUSION. In comparison with conventional treatment approaches, the use of cell therapies and tissue-engineered products can help effectively eliminate defects in various body tissues, avoid highly invasive surgical interventions, and reduce regeneration time. Thus, ensuring development of similar but at the same time more affordable Russian medicinal products can bring great benefits for the healthcare system of the Russian Federation.

Keywords: cell therapy; cell-based medicinal products; tissue-engineered products; gene therapy; advanced therapy medicinal products; ATMP; mesenchymal stem cells; limbal stem cells; haematopoietic stem cells; CAR-T cell therapy; CAR-NK cell therapy; clinical trials

For citation: Galitsyna E.V., Kulikova E.A., Pavelyev Yu.A., Kuznetsova O.S., Senina A.S., Gusev A.B. Cell-based medicinal products: a review of current research. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):428–442. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-557>

Funding. This study was funded by the Ministry of Health of Russia to support the activities of the Coordinating Centre for Research and Development in Medical Science of the Russian Research Institute of Health in coordinating the implementation of the federal project Medical Science for People.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Результаты доклинических и клинических исследований препаратов клеточной терапии и тканевой инженерии подтверждают возможность эффективного лечения генетических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и онкологических заболеваний, травм опорно-двигательного аппарата, повреждений кожных покровов, роговицы глаза, спинного мозга и др. [1–3]. Аутологичные и аллогенные препараты клеточной терапии и тканевой инженерии могут содержать мезенхимальные стволовые клетки (МСК), лимбальные стволовые клетки (ЛСК), эпителиальные клетки, хондроциты, нативные или генетически модифицированные гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и генетически модифицированные лимфоциты (CAR-T, CAR-NK).

В Российской Федерации согласно решению № 78 Евразийского экономического союза (ЕАЭС)¹ лекарственные препараты на основе соматических клеток, тканеинженерные лекарственные препараты (препараты тканевой инженерии) и генотерапевтические лекарственные препараты классифицируют как высокотехнологичные лекарственные препараты.

Терапия с использованием клеточных продуктов характеризуется более высокой эффективностью и меньшим количеством побочных эффектов по сравнению со стандартными методами лечения, особенно высокоинвазивными хирургическими вмешательствами, однако к недостаткам клеточной терапии можно отнести риск формирования иммунных реакций при применении аллогенных клеток или ксеногенных компонентов в составе продуктов, а также риск мутагенеза (в случае использования технологии CRISPR/Cas9 или лентивирусных векторов) [4–6]. Тем не менее при назначении препаратов клеточной терапии вероятность пользы, как правило, многократно превышает вероятность риска, в связи с чем клеточные продукты становятся препаратами выбора.

Большинство препаратов клеточной терапии и тканевой инженерии предназначены для персонализированного использования (должны быть индивидуально изготовлены для каждого пациента), что обуславливает длительный и трудозатратный процесс их изготовления с применением дорогостоящих реактивов, расходных материалов и оборудования, что, в свою очередь, является причиной высокой стоимости таких препаратов.

В последние годы ряд препаратов на основе клеточных технологий получил одобрение

во многих странах: США (около 30), странах Европейского союза (около 20), Японии (18), Южной Кореи (15) и др. В Российской Федерации зарегистрировано только два препарата на основе клеток – один на основе CAR-T-лимфоцитов (генотерапевтический препарат), другой на основе хондроцитов (биомедицинский клеточный продукт) – при этом только последний является российской разработкой. В связи с этим создание безопасных и эффективных препаратов клеточной терапии является одной из важных задач системы здравоохранения Российской Федерации.

Цель работы – обзор основных направлений клеточной терапии, анализ данных об одобренных лекарственных препаратах клеточной терапии и тканевой инженерии, оценка проблем и перспектив их использования.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Лекарственные препараты на основе аутологичных и аллогенных клеток

Терапия на основе мезенхимальных стволовых клеток

Аутологичные МСК, полученные непосредственно от пациента, и аллогенные МСК, полученные от доноров, относятся к наиболее безопасным типам культур для изготовления препаратов клеточной терапии [6]. Основным преимуществом аутологичных клеток является отсутствие иммунного отторжения, помимо этого, культуры таких клеток легко выделить и масштабировать. Тем не менее в отношении аутологичных МСК требуется несколько недель для выделения и получения культуры *in vitro*. Преимуществами аллогенных МСК являются возможность выбора донора, как правило, более широкий диапазон тканей-источников забора клеточного материала и доступность в виде готового препарата. Однако аллогенные МСК могут индуцировать ответ иммунной системы реципиента, в том числе реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [7].

Боковой амиотрофический склероз. Это нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью двигательных нейронов и имеющее как аутоиммунную воспалительную, так и наследственную этиологию [8, 9], для лечения которого может применяться клеточная терапия.

Препарат Neuronata-R (Corestem), представляющий собой аутологичные МСК, полученные из костного мозга, предназначен для лечения бокового амиотрофического склероза. В 2014 г. препарат был зарегистрирован в Южной

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

Корее. Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) в 2021 г. одобрило проведение клинического исследования (КИ) 3 фазы для регистрации препарата в США в случае достижения успешных результатов. Согласно данным разработчика через 6 мес. после терапии Neuronata-R состояние пациентов с боковым амиотрофическим склерозом функционально стабилизировалось в 63% случаев против 22% пациентов в контрольной группе (идентификационный номер КИ в системе ClinicalTrials.gov: NCT01363401) [10].

Травмы спинного мозга. В 2018 г. в Японии получил условное одобрение препарат Stemirac (Nipro Corporation) для лечения повреждений спинного мозга. Он выпускается в лекарственной форме, предназначенной для внутривенной инфузии аутологичных МСК, выделенных из костного мозга. Согласно данным КИ, у 12 из 13 пациентов с травмами спинного мозга через 6 мес. после инфузии препарата были отмечены неврологические улучшения [11].

Реакция «трансплантат против хозяина». РТПХ представляет собой мультисистемное алло/аутоиммунное заболевание, характеризующееся иммунной дисрегуляцией, иммунодефицитом и поражением внутренних органов.

В 2015 г. препарат Temcell HS (JCR Pharmaceuticals, лицензиат Mesoblast Ltd) был одобрен в Японии по итогам анализа результатов двух КИ, проведенных на территории США и Японии, как первый лекарственный препарат клеточной терапии на основе аллогенных клеток. Препарат Temcell HS состоит из МСК, полученных из клеток костного мозга, и предназначен для лечения острой алло- и аутоиммунной РТПХ после трансплантации ГСК² [12]. Следует отметить, что в 2023 г. FDA отказало компании Mesoblast Ltd в регистрации данного препарата под торговым названием Remestemcel-L в США для применения у детей по причине непредоставления дополнительно запрашиваемых FDA данных³.

Болезнь Крона. Применение препаратов клеточной терапии особенно востребовано при лечении перианальных свищей – одного из основных осложнений болезни Крона [13]. В 2012 г.

в Южной Корее был одобрен препарат Cupistem (Anterogen) для лечения данной нозологии, представляющий собой аутологичные МСК, полученные из жировой ткани. В КИ с участием пациентов со сложными перианальными свищами при болезни Крона было показано полное заживление у 82% пациентов на 8 нед. после введения препарата, а у 81% пациентов на 96 нед. сохранялся устойчивый ответ.

В 2018 г. Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) был одобрен препарат на основе соматических клеток – Alofisel (Takeda Pharmaceutical), для лечения сложных перианальных свищей при люминальной (воспалительной) форме болезни Крона⁴. В 2021 г. компанией-разработчиком было получено разрешение на его производство и продажу в Японии. Основу препарата составляют МСК, полученные из аллогенной жировой ткани. По данным КИ число пациентов в группе препарата Alofisel, достигших первичной конечной точки (ремиссии) через 24 нед. наблюдения, составило 51,5% против 35,6% в контрольной группе, после чего ремиссия сохранялась в течение 52 нед. – 56,3% против 38,6% в контрольной группе⁵. В настоящий момент помимо ЕС и Японии препарат Alofisel одобрен в Великобритании, Израиле и Швейцарии⁶.

Остеоартрит. Лекарственный препарат клеточной терапии MesestroCell (Cell Tech Pharmed) был одобрен в 2018 г. в Иране для лечения остеоартрита коленного сустава. Препарат состоит из аутологичных МСК, выделенных из костного мозга, и однократно вводится в полость коленного сустава пациента путем инъекции. При проведении КИ препарата было показано, что положительный эффект терапии наступает примерно через 6 мес. после инъекции⁷ [13].

Терапия на основе лимбальных стволовых клеток и эпителиальных клеток

Ожоги 2–3 степени тяжести. Клеточные технологии особенно востребованы при лечении обширных и глубоких ожогов. В 2007 г. компания Japan Tissue Engineering Co. Ltd получила разрешение на продажу первого лекарственного препарата регенеративной медицины в Японии под торговым наименованием JACE, показанного к применению при глубоких ожогах. Препарат представляет собой «клеточный лист» на основе

² <https://www.marketscreener.com/quote/stock/JCR-PHARMACEUTICALS-CO--11551531/news/JCR-Pharmaceuticals-Announces-Discontinuation-of-Development-of-JR-031EB-Expanded-Indication-of-T-32629098/>

³ <https://www.targetedonc.com/view/fda-denies-approval-of-remestemcel-l-for-pediatric-sr-agvhd>

⁴ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/alofisel>

⁵ <https://www.takeda.com/newsroom/newsreleases/2021/takeda-receives-approval-to-manufacture-and-market-alofisel-darvadstrocel-in-japan-for-treatment-of-complex-perianal-fistulas-in-patients-with-non-active-or-mildly-active-luminal-crohns-disease/>

⁶ <https://www.bloomberg.com/press-releases/2022-02-18/alofisel-darvadstrocel-shows-clinical-remission-rate-at-six-months-in-the-real-world-inspire-study-interim-analysis>

⁷ <http://en.celltech.ir/mesestrocell-cell-therapy-for-osteoarthritis/>

эпидермальных клеток, выделенных из собственной эпидермальной ткани пациента (аутологичный культивируемый эпидермис). Такие листы пересаживают на раневую поверхность с сохраненной дермой для закрытия раны⁸. В 2016 г. было получено разрешение на расширение показаний к применению препарата JACE для лечения гигантского врожденного меланокитарного невуса, а в 2018 г. — для лечения дистрофического и узлового буллезного эпидермолиза (оба заболевания являются орфанными).

Препарат Holoderm (Tego Science Inc.) — первый коммерческий культивируемый аутоотрансплантат кожи, разработанный и одобренный в Южной Корее в 2002 г. Продукт показан для лечения глубоких и обширных ожогов 2 и 3 степени и представляет собой «клеточный лист», полученный из кератиноцитов пациента. Культивирование клеток из небольшого биоптата (1–3 см²) занимает 2–3 нед., в течение которых можно получить достаточное количество «клеточных листов» для проведения лечения даже в случае обширных ожогов (около 50% поверхности тела). В период КИ было продемонстрировано отсутствие иммунологического отторжения препарата в более чем 90% случаев. По данным компании-разработчика препарата положительный эффект терапии выявлен более чем в 700 случаях его применения с 2002 г.⁹

Препарат Kaloderm (Science Inc.) был одобрен в Южной Корее для лечения глубоких ожогов 2 степени в 2005 г. и диабетических язв стопы в 2010 г. Kaloderm представляет собой «клеточные листы» аллогенного происхождения, выращенные из кератиноцитов крайней плоти новорожденных, которые могут храниться при температуре минус 60 °С в течение 24 мес. По данным компании-разработчика с момента одобрения препарат был востребован в основном в ожоговых отделениях больниц (всего было использовано около 300000 «клеточных листов»)¹⁰.

В 2016 г. FDA был одобрен препарат Epicel (Vericel Corporation), представленный культивируемым эпидермальным аутоотрансплантатом в виде «клеточного листа», состоящего из аутологичных кератиноцитов выращенных *ex vivo* в присутствии неделящихся фибробластов мыши (фидерный слой). Препарат разрешен для применения у взрослых и детей с глубокими неполнослойными и полнослойными ожогами, площадь которых равна или превышает 30% от общей площади поверхности тела. По данным

КИ, показатели выживаемости после лечения препаратом Epicel через 3 мес. после проведения процедуры пересадки составляли более 80% для всех пациентов. Согласно сведениям о клиническом опыте применения препарата (2016 г.) — выживаемость пациентов (число пациентов в исследовании — 8870 человек) с ожогами общей площади поверхности тела от 30 до 90% составила 68%¹¹ [14].

Система ReCell System и усовершенствованная система ReCell Autologous Cell Harvesting Device (AVITA Medical, Великобритания) были одобрены FDA в 2018 и 2022 гг. Данные системы представляют собой устройства для сбора клеток пациента и приготовления из них аутологичной эпидермальной клеточной суспензии непосредственно в клинике. Суспензия содержит гетерогенную популяцию клеток, включающую кератиноциты, фибробласты и меланоциты, и распыляется на пораженный участок. Устройства предназначены для лечения острых термических ожогов площадью до 20% от общей площади поверхности тела у детей и взрослых [14]. По результатам КИ эффективность применения систем ReCell превосходила традиционно используемый сетчатый трансплантат кожи (идентификационный номер КИ в системе ClinicalTrials.gov: NCT04091672).

Повреждение эпителия роговицы. Эпителий роговицы способен к быстрому самообновлению благодаря ЛСК, расположенным в зоне лимба. Дефицит ЛСК проявляется комплексным нарушением процессов эпителизации и неоваскуляризации роговицы. Данная патология возникает при химических и термических повреждениях глаза; кератопатии, вызванной ношением контактных линз; хирургических вмешательствах в лимбальной области. «Золотым стандартом» лечения стромальных кератитов, дистрофических поражений роговицы, а также ее тяжелых травм является кератопластика — трансплантация донорской роговицы. Альтернативным методом лечения может выступать применение «клеточных листов», полученных из ЛСК и эпителиальных клеток роговицы пациента. В случае двухстороннего поражения глаз и невозможности получить клетки из тканей глаза альтернативным источником для получения таких листов могут служить эпителиальные клетки слизистой оболочки полости рта. «Клеточный лист» трансплантируют на открытую раневую поверхность роговицы или склеры после удаления фиброзной ткани.

⁸ <https://www.jpste.co.jp/sys/upload/save/170692808560558125976d0.pdf>

⁹ https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_30/view.do?seq=71359&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1

¹⁰ Там же.

¹¹ <https://www.epicel.com/>

Препарат Nepic (Japan Tissue Engineering Co. Ltd) стал первым в Японии продуктом регенеративной медицины в области офтальмологии. Он был одобрен в 2020 г. и представляет собой «клеточный лист» из аутологичных эпителиальных клеток роговицы и ЛСК, полученных из ткани лимба роговицы человека. Nepic предназначен для реконструкции эпителия роговицы у пациентов с дефицитом ЛСК и показан к применению у пациентов с синдромом Стивенса – Джонсона, глазным рубцующим пемфигоидом, РТПХ, аниридией или другой врожденной дисплазией эпителиальных стволовых клеток роговицы, рецидивирующим птериgiumом и идиопатическим дефицитом эпителиальных стволовых клеток роговицы¹².

Другим аналогичным препаратом является Ocural (Japan Tissue Engineering Co. Ltd), одобренный в 2021 г. в Японии. Это аутологичный лист эпителиальных клеток слизистой оболочки полости рта, показанный к применению при дефиците ЛСК для восстановления эпителия роговицы при ее обширных повреждениях. Применение препарата Ocural расширяет возможности терапии повреждений эпителия роговицы, для которых ранее не существовало эффективного метода лечения, и показано для пациентов, которым не подходит Nepic¹³.

Препарат Sakracy (Applicant Hirosaki Lifescience Innovation Inc.) для лечения заболеваний поверхности глаза, сопровождающихся дефицитом ЛСК, был разработан и одобрен в Японии в 2022 г. Он представляет собой «клеточный лист», полученный путем культивирования аутологичных эпителиальных клеток слизистой оболочки полости рта с использованием амниотической мембраны человека в качестве субстрата. Препарат показан к применению при термических и химических ожогах, поражении глаз при синдроме Стивенса – Джонсона и рубцующем пемфигоиде конъюнктивы¹⁴.

Острая сердечная недостаточность. HeartSheet (Terumo Corporation) был одобрен в Японии в 2015 г. как первый препарат на основе клеток, предназначенный для лечения сердечно-сосудистого заболевания. Препарат в виде «клеточного листа» на основе аутологичных миоцитов, полученных из скелетных мышц, показан для лечения тяжелой сердечной

недостаточности, вызванной хронической ишемической болезнью сердца, не поддающейся стандартной терапии. В первом КИ препарата в Японии участвовало всего семь пациентов, и оценить его эффективность оказалось сложно из-за нерепрезентативности выборки. Однако компании-разработчику было разрешено учесть данные еще одного КИ с участием 19 пациентов [12]. В итоге объединенные данные двух исследований сочли достаточными для решения о безопасности и эффективности, и условное одобрение было получено. Препарат HeartSheet состоит из двух наборов: набора А для сбора клеток пациента и набора В для их культивирования и создания «клеточного листа». По оценкам Terumo Corporation продукт может быть использован для лечения от 20 до 30 пациентов в год¹⁵ [12, 15].

Терапия на основе гормонпродуцирующих (эндокринных) клеток

Сахарный диабет 1 типа. В 2023 г. FDA был одобрен первый препарат клеточной терапии для пациентов с диабетом – Lantidra (CellTrans Inc.). Данный продукт в виде аллогенных островковых клеток поджелудочной железы предназначен для лечения взрослых с диабетом 1 типа, у которых не достигается нормальный уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) из-за регулярно повторяющихся эпизодов тяжелой гипогликемии, несмотря на интенсивное лечение. Препарат показан к применению совместно с иммуносупрессивной терапией для предотвращения иммунного ответа вследствие использования донорских клеток. Безопасность и эффективность Lantidra были подтверждены в двух КИ с участием 30 пациентов с диабетом 1 типа. Продемонстрировано, что после 1–3 инфузий препарата в воротную вену печени у 21 участника КИ не возникло необходимости в применении инсулина в течение года и более, при этом у 11 участников не возникла потребность в инсулине на протяжении длительного периода времени – от года до пяти лет, 10 участникам инсулин не требовался более пяти лет. Однако для 5 участников КИ терапия с помощью Lantidra была неэффективна¹⁶.

Следует отметить, что в Российской Федерации данный препарат относится к объектам трансплантации согласно Приказу Минздрава

¹² <https://www.jpote.co.jp/sys/upload/save/1781936322605580b159937.pdf>

¹³ <https://www.jpote.co.jp/sys/upload/save/87335219561415f1acd33e.pdf>

¹⁴ <https://www.pmda.go.jp/english/review-services/reviews/approved-information/0004.html>

¹⁵ <https://www.pmda.go.jp/files/000247920.pdf>

¹⁶ <https://www.terumo.com/newsrelease/detail/20160606/299>

¹⁶ <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/lantidra>

<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-cellular-therapy-treat-patients-type-1-diabetes>

России и Российской академии наук № 306н/3 (пункт 25)¹⁷.

Терапия на основе клеток тимуса

Врожденная атимия – редкое иммунное заболевание, при котором ребенок рождается без тимуса – органа, играющего основную роль в формировании иммунитета. Дети с этой патологией обычно умирают в течение первых двух лет жизни¹⁸.

В 2021 г. FDA был одобрен первый продукт из аллогенной ткани тимуса – препарат Rethymic (Sumitomo Pharma Co. Ltd), применение которого показано для восстановления иммунитета у детей с врожденной атимией. Препарат в виде фрагментов ткани вводится хирургическим путем в четырехглавую мышцу бедра. Дозировка подбирается индивидуально и определяется площадью поверхности тела пациента. Результаты КИ с участием 105 пациентов с врожденной атимией или синдромом Ди Джорджи (аплазия тимуса и паращитовидных желез) показали, что применение терапии с помощью Rethymic может привести к восстановлению иммунитета и увеличить продолжительность жизни, однако при их проведении 29 пациентов умерли, в том числе 23 умерли в первый год после имплантации препарата, в основном вследствие инфекции и ее осложнений, а также сердечной или дыхательной недостаточности. Следует отметить, что из этих 29 случаев летального исхода только 3 сочли не связанными с введением препарата, что свидетельствует о высоком риске применения терапии. Кроме того, пациенты после введения препарата Rethymic подвергаются риску развития лимфопролиферативных заболеваний. При производстве препарата используют ксеногенные реактивы (полученные из организма свиньи и крупного рогатого скота), что может привести к передаче инфекционных заболеваний. Кроме этого, возможно развитие РТПХ. При проведении КИ было отмечено 11 таких случаев¹⁹.

Терапия на основе генетически модифицированных лимфоцитов

Лечение онкологических заболеваний с использованием CAR-T клеток. CAR-T терапия основана на применении Т-клеток с химерным антигенным

рецептором (chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T), полученных при их генетической модификации *in vitro* (рис. 1). Эти рецепторы состоят из внеклеточного антигенсвязывающего домена и внутриклеточных сигнальных доменов, активирующих Т-клетки при связывании с соответствующим антигеном и иницирующих лизис опухолевых клеток-мишеней [16, 17]. CAR-T терапия демонстрирует высокую эффективность, в том числе положительные результаты у тех пациентов, которым не помогли один или несколько курсов стандартного лечения [18]. В настоящее время в США и Европе зарегистрировано шесть CAR-T препаратов для лечения злокачественных новообразований. В Российской Федерации их классифицируют как генотерапевтические лекарственные препараты согласно решению № 78 ЕАЭС²⁰.

В качестве основы для CAR-T препаратов могут быть использованы как аутологичные, так и аллогенные клетки [19], однако аутологичные клетки применяют намного чаще.

Препарат Kymriah (Novartis) был одобрен FDA в 2017, EMA – в 2018 г. Он предназначен для терапии В-клеточного острого лимфобластного лейкоза у детей и взрослых, рефрактерного к терапии или рецидивировавшего по крайней мере 2 раза. Kymriah также показан для лечения пациентов с неходжкинскими лимфомами: В-клеточной крупноклеточной лимфомой и фолликулярной лимфомой при рецидиве или рефрактерности после проведения как минимум двух других видов терапии. Согласно результатам КИ применение препарата позволило достигнуть полной ремиссии (отсутствия каких-либо признаков заболевания) у 66% пациентов в течение 3 мес. после курса терапии, что было значительно выше по сравнению с показателями у пациентов, получавших стандартную терапию. Спустя 12 мес. после применения препарата Kymriah вероятность выживания пациентов первой группы составляла 70%²¹.

В 2023 г. в соответствии с требованиями ЕАЭС Минздрав России зарегистрировал лекарственный препарат Kymriah под наименованием «Кимрая». На момент подготовки данной статьи

¹⁷ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации и Российской академии наук от 04.06.2015 № 306н/3 «Об утверждении перечня объектов трансплантации».

¹⁸ <https://www.pmda.go.jp/english/review-services/reviews/approved-information/0004.html>

¹⁹ <https://rethymic.com/hcp/clinical-trial-results/>
<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/rethymic>
<https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05329935>

²⁰ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

²¹ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kymriah>
<https://www.us.kymriah.com/>

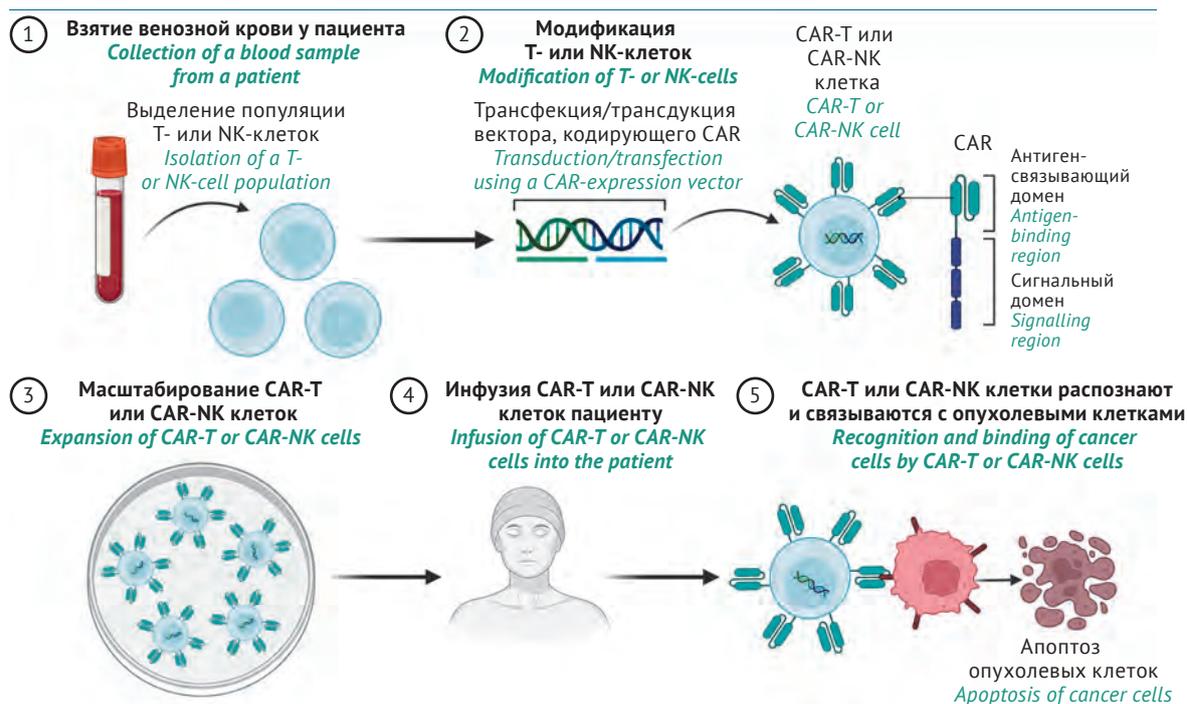


Рисунок подготовлен авторами с использованием шаблонов biorender.com / This figure is prepared by the authors using the templates from biorender.com

Рис. 1. Схема терапии, основанной на применении Т- или NK-клеток с химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptor, CAR) – CAR-T или CAR-NK.

Fig. 1. Flowchart of treatment based on chimeric antigen receptor T-cells (CAR-T) or NK-cells (CAR-NK).

данный препарат является первым и единственным CAR-T препаратом, зарегистрированным на территории Российской Федерации²².

Препарат Yescarta (Gilead Sciences Inc.), разработанный для терапии неходжкинских лимфом (В-клеточная крупноклеточная лимфома и фолликулярная лимфома), был одобрен FDA в 2017 г., в EMA – в 2018 г.²³ При проведении КИ с участием пациентов с В-клеточной лимфомой, рефрактерной к стандартной химиотерапии, был достигнут полный ответ у 47% и частичный ответ у 66% пациентов. Клинические результаты были значимо выше по сравнению с таковыми для группы пациентов, получавших стандартную химиотерапию, у которых полный ответ достигался в 7% случаев и частичный ответ – в 26% случаев²⁴.

В 2021 г. FDA был одобрен препарат Breyanzi (Bristol-Myers Squibb) для лечения рецидивирующей и рефрактерной В-клеточной крупноклеточной лимфомы после двух или более линий системной терапии. В 2022 г. показания к применению препарата были расширены: Breyanzi

рекомендован для лечения рецидивирующей и рефрактерной В-клеточной крупноклеточной лимфомы после предшествующей терапии в случае, если первый курс лечения не был эффективным, или произошел рецидив заболевания сразу после терапии или в течение года, или если к пациенту неприменима трансплантация ГСК из-за состояния здоровья или возраста, а также в случае если два или более предшествующих вида терапии оказались неэффективными²⁵.

Препарат Tecartus (Kite Pharma, Gilead Sciences Inc.) был одобрен FDA в 2020 г., а затем в ЕС и Великобритании. Предназначен для лечения взрослых с мантийноклеточной лимфомой или острым лимфобластным лейкозом во время или после прогрессирования заболевания²⁶. В настоящее время данный препарат является первым и единственным терапевтическим средством на основе CAR-T клеток для взрослых пациентов, страдающих рецидивирующей и рефрактерной мантийноклеточной лимфомой. При проведении КИ было показано, что полная ремиссия была достигнута у 59% пациентов,

²² <https://medvestnik.ru/content/news/V-Rossii-zaregistrovali-pervyi-preparat-dlya-CAR-T-terapii.html/>

<https://grls.rosminzdrav.ru>

²³ <https://www.yescarta.com/>

²⁴ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/yescarta>

²⁵ <https://www.breyanzi.com/>

<https://media.celltherapy360.com/wp-content/uploads/Breyanzi-Codes-and-Sample-Claims.pdf>

²⁶ <https://www.tecartus.com/>

что превосходит полученные при использовании стандартной терапии результаты²⁷.

Препарат Абесма (Bristol-Myers Squibb), предназначенный для терапии рецидивирующей и рефрактерной множественной миеломы, был одобрен в 2021 г. FDA и EMA. При проведении КИ с участием пациентов, рефрактерных к стандартной терапии, была достигнута полная ремиссия у 28–30% и частичный ответ у 67–72%²⁸.

Другой препарат для лечения рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломы под торговым названием Carvykti (Janssen Pharmaceutical) был одобрен FDA в 2022 г. Carvykti показал высокую эффективность в КИ с участием пациентов, у которых не было ответа на три или более предыдущих курса лечения. Через 6 мес. терапии препаратом Carvykti около 84% пациентов (95 из 113) продемонстрировали хороший ответ на лечение, а у 69% (78 из 113) наблюдалась полная ремиссия. Результаты КИ в группе Carvykti превосходили по эффективности стандартную терапию²⁹.

Лечение онкологических и нейродегенеративных заболеваний с использованием NK и CAR-NK терапии. Естественные киллеры (natural killer, NK) могут быть генетически модифицированы для получения популяции клеток с химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptor natural killer, CAR-NK), способных распознавать и уничтожать определенные типы клеток благодаря наличию специфических лигандов на поверхности клеток-мишеней (рис. 1). В настоящее время CAR-NK клетки применяют для лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний [20].

CAR-NK клетки имеют ряд преимуществ по сравнению с CAR-T клетками. NK-клетки обладают спонтанной цитотоксической активностью и могут вызывать гибель клеток-мишеней независимо от продуцируемых ими опухолевыми клетками иммунного обнаружения [21]. NK-клетки продуцируют цитокины (интерферон- γ , интерлейкин-3 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), которые отличаются от спектра провоспалительных

цитокинов, секретируемых Т-клетками, способных инициировать синдром высвобождения цитокинов. Кроме того, возможно использовать аллогенные NK-клетки здоровых доноров в качестве источника для получения культур и их хранения в криоконсервированном виде. Таким образом, считается, что линии CAR-NK клеток более эффективны и безопасны для терапии онкологических заболеваний, чем CAR-T клетки [21].

В 2020–2023 гг. FDA одобрило несколько заявок на проведение КИ лекарственных препаратов NK-терапии³⁰.

Компанией NKGen Biotech разработан продукт для инновационной клеточной иммунной терапии на основе NK-клеток для пациентов с нейродегенеративными и онкологическими заболеваниями. В настоящее время проводятся КИ эффективности и безопасности NK-клеток у пациентов с болезнью Альцгеймера (препарат SNK01, идентификационный номер КИ в системе ClinicalTrials.gov: NCT04678453) и рефрактерными солидными опухолями (препарат SNK02, идентификационный номер КИ в системе ClinicalTrials.gov: NCT05990920)³¹.

Компанией Syena разработан продукт на основе TCR-модифицированных NK-клеток (NY-ESO-1 TCR/IL-15 NK) для лечения рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы, синовиальной саркомы и миксоидной/круглоклеточной липосаркомы (идентификационные номера КИ в системе ClinicalTrials.gov: NCT06083883, NCT06066359).

Препарат CYNK-001 (Celularity Inc.) для лечения пациентов с острым миелоидным лейкозом, множественной миеломой и рецидивирующей мультиформной глиобластомой является единственным препаратом на основе криоконсервированных аллогенных клеток для проведения NK-клеточной терапии, который включает NK-клетки CD56⁺ и CD3⁺, полученные из ГСК CD34⁺ плаценты человека. Эти клетки не являются генетически модифицированными. КИ препарата проводились в том числе с участием пациентов с умеренными проявлениями коронавирусной инфекции в период пандемии COVID-19

²⁷ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tecartus>

²⁸ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/abecma>
<https://www.abecma.com/abecma-treatment-outcomes/abecma-results/>

²⁹ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/carvykti>

³⁰ <https://nkgenbiotech.com/nkgen-biotech-announces-fda-clearance-of-investigational-new-drug-application-for-snk01-nk-cell-therapy-to-treat-alzheimers-disease/>

<https://www.onclive.com/view/fda-clears-investigational-new-drug-application-for-tcr-nk-cell-therapy-in-multiple-myeloma>
<https://www.cancernetwork.com/view/fda-grants-natural-killer-cell-therapy-cynk-001-fast-track-designation-for-acute-myeloid-leukemia>

<https://celularity.com/fda-clears-ind-application-for-natural-killer-cell-based-covid-19-therapy/>

³¹ <https://nkgenbiotech.com/clinical-trials/>

³² <https://www.susupport.com/knowledge/cell-gene-therapy/autologous-allogeneic-cell-therapy>

(идентификационные номера КИ в системе ClinicalTrials.gov: NCT04310592; NCT04365101; NCT04489420; NCT04309084; NCT05218408). В настоящее время препарат проходит 1 и 1/2а фазы клинических исследований.

Терапия на основе гемопоэтических стволовых клеток

Онкологические заболевания. Терапия аллогенными ГСК часто используется у пациентов, чьи собственные стволовые клетки не подходят для трансплантации, например у пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями, такими как лейкемия, или заболеваниями системы кровообращения, такими как миелодиспластический синдром³².

Препарат Omisirge (Gamida Cell Ltd) был одобрен в 2023 г. FDA и получил статус орфанного препарата. Фармацевтическая субстанция представляет собой никотинамид-модифицированные аллогенные ГСК, выделенные из пуповинной крови. Препарат предназначен для лечения гематологических злокачественных новообразований у взрослых и детей (12 лет и старше), которым планируется трансплантация клеток пуповинной крови после миелоаблативного кондиционирования с целью снизить риск возникновения инфекций. В отличие от зарегистрированных препаратов пуповинной крови Omisirge вводится в виде однократной внутривенной инфузии. Результаты КИ с участием 37 пациентов (17 – введение препарата Omisirge, 20 – введение пуповинной крови) показали, что Omisirge способствует более быстрому восстановлению иммунной системы, включая восстановление популяции NK-клеток и Т-хелперов, чем препарат пуповинной крови. Вследствие этого у пациентов, которым вводили Omisirge, наблюдалось снижение частоты вирусных инфекций по сравнению с пациентами, которым проводили инфузии препаратов пуповинной крови³³.

Серповидно-клеточная анемия и β-талассемия. В 2023 г. FDA было одобрено два препарата – Casgevy и Lyfgenia, представляющих собой первые препараты на основе генетически модифицированных клеток для лечения серповидно-клеточной анемии с рецидивирующими вазоокклюзивными кризами у пациентов, достигших возраста 12 лет и старше. Препарат Casgevy также показан для применения при трансфузионно-зависимой β-талассемии. В 2024 г.

он был одобрен ЕМА для лечения тех же нозологий. Casgevy является первым в мире зарегистрированным для медицинского применения продуктом, в котором используется технология редактирования генома CRISPR/Cas9.

При изготовлении препарата Casgevy аутологичные ГСК пациента модифицируют с помощью технологии CRISPR/Cas9 в области специфического энхансера гена *BCL11A* с целью снижения экспрессии данного гена в клетках эритроидного происхождения, что приводит к увеличению экспрессии γ-глобина и синтеза фетального гемоглобина (HbF), а также снижению внутриклеточной концентрации аномального гемоглобина S (HbS)³⁴. В ходе КИ у 29 из 31 пациента с серповидно-клеточной анемией наблюдалось значительное снижение рецидивов вазоокклюзивных кризов и не было зафиксировано инцидентов, которые привели к госпитализации (таких пациентов госпитализируют в среднем 2,7 раза в год)³⁵. При проведении КИ показана высокая эффективность препарата не только для лечения серповидно-клеточной анемии, но и для лечения β-талассемии [22] (идентификационные номера КИ в системе ClinicalTrials.gov: NCT03655678, NCT03745287).

Препарат Lyfgenia представляет собой аутологичные модифицированные ГСК с дополнительными функциональными копиями модифицированного гена β-глобина (треонин заменен на глутамин в положении 87 – T87Q или βA-T87Q-глобин), внесенных с помощью трансдукции лентивирусным вектором BB305 (BB305 LVV)³⁶. Синтезируемый такими клетками гемоглобин HbA T87Q функционирует аналогично HbA³⁷. Выбор данного типа вектора в составе препарата обусловлен наиболее эффективной интеграцией трансгена в хромосомную ДНК в отличие от плазмидных, аденоассоциированных и аденовирусных векторов [5].

Таким образом, представленные в разделе данные демонстрируют, что клетки организма человека могут быть выделены и масштабированы в условиях *in vitro* и применяться в виде аутологичных или аллогенных препаратов, в том числе после генетической модификации (данные с подготовленной авторами информацией о препаратах на основе аутологичных и аллогенных стволовых клеток – МСК и ЛСК, гемопоэтических стволовых клеток, препаратах

³³ <https://investors.gamida-cell.com/news-events/press-releases/news-release-details/data-published-transplantation-and-cellular-therapy/>

³⁴ <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/omisirge>

³⁵ <https://www.medpagetoday.com/opinion/second-opinions/107793>

³⁶ <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/lyfgenia>

³⁷ <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapies-treat-patients-sickle-cell-disease>

CAR-T терапии находятся в открытом доступе в системе Mendeley Data³⁸).

Следует отметить, что для повышения эффективности генетически модифицированных клеточных препаратов необходимо преодолеть ряд трудностей, к которым относятся, в том числе, низкая эффективность трансфекции, а также проблемы, связанные с иммуносупрессивной активностью опухолевого микроокружения и неспособностью этих клеток (в случае противоопухолевых CAR-T и CAR-NK клеток) проникать в участки солидной опухоли. Низкая способность таких клеток к делению в условиях *in vivo* может привести к увеличению частоты инъекций и дозы препарата, что может негативно влиять на показатели безопасности терапии [21, 23].

Лекарственные препараты тканевой инженерии

Трансплантация клеток может быть не всегда эффективна в связи с их непродолжительной жизнеспособностью и ограниченной адгезией в зоне тканевого дефекта. Применение препаратов тканевой инженерии в виде клеточных продуктов, в том числе с использованием биологических или синтетических полимеров, перспективно для заполнения пустот в поврежденных тканях, обеспечения их структурной поддержки и эффективной регенерации [24].

Препараты на основе лимбальных стволовых клеток

В 2015 г. ЕМА был одобрен орфанный препарат³⁹ тканевой инженерии Holoclar, представленный матриксом из фибринового гидрогеля, который содержит популяцию аутологичных эпителиальных клеток роговицы и ЛСК, выделенных из лимба роговицы. Препарат Holoclar показан для применения у взрослых пациентов при термических и химических ожогах глаз, спровоцировавших умеренную или тяжелую недостаточность ЛСК. После имплантации препарата способные к делению, самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток роговицы ЛСК служат источником новых клеток [25]. По результатам КИ через год после имплантации препарата Holoclar у 72% пациентов (75 из 104) с умеренным или тяжелым дефицитом ЛСК, вызванным ожогами, процедура была признана успешной на основании состояния роговицы. У участников исследования наблюдалось

уменьшение воспаления глаз и боли, а также улучшение остроты зрения.

Препараты на основе эпителиальных клеток

В 2018 г. в США был зарегистрирован препарат тканевой инженерии Gintuit (Organogenesis Inc.) – первый одобренный лекарственный препарат клеточной терапии, изготовленный из аллогенных кератиноцитов и фибробластов человека, импрегнированных в матрикс из бычьего коллагена. Препарат предназначен для местного помещения на хирургически созданное ложе сосудистой раны при лечении поражений слизистой оболочки рта и десен у взрослых⁴⁰.

Препарат тканевой инженерии StrataGraft (Stratatech Corporation), одобренный в 2021 г. FDA, создан на основе аллогенных кератиноцитов и дермальных фибробластов, культивируемых на матрице из мышинового коллагена, и показан для лечения взрослых с термическими глубокими ожогами. При проведении КИ не было сообщений об отторжении Stratagraft⁴¹. Через 3 мес. после трансплантации препарата Stratagraft и аутоотрансплантатов (группа сравнения) пациентам с термическими ожогами (от 3 до 49% общей площади поверхности тела) в обеих группах наблюдалось снижение площади пораженных участков, однако данный показатель при терапии Stratagraft был на 96% выше по сравнению с группой с аутоотрансплантацией [26].

Препараты на основе мезенхимальных стволовых клеток и хондроцитов

МСК и хондроциты, а также биоматериалы, содержащие данные типы клеток, активно используются для регенерации тканей опорно-двигательного аппарата – костной, хрящевой ткани суставов, а также тканей мышц и сухожилий.

В исследовании 2021 г. описан коллагеновый имплантат, содержащий тромбин, фибриноген, хитозан и каркас на основе гиалуроновой кислоты, который инкубировали с аутологичным аспирином костного мозга, содержащим МСК. Описанный продукт перспективен для восстановления хрящевой ткани и помогает избежать возможных осложнений в виде образования микротрещин и микропереломов донорского участка кости [27].

При трансплантации аутологичных хондроцитов на первом этапе проводится забор тканей пациента – из зоны сустава, не подвергающейся нагрузке, отбирают небольшие фрагменты хряща, из которых выделяют культуру хондроцитов.

³⁸ <https://data.mendeley.com/datasets/tndkgcbtbp/1>
<https://data.mendeley.com/datasets/t7s5jxm8r6/1>
<https://data.mendeley.com/datasets/vmkw5m84pb/1>
<https://data.mendeley.com/datasets/wnmcn4wdpc/1>

³⁹ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/holoclar>

⁴⁰ <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/gintuit-questions-and-answers>

⁴¹ <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/stratagraft>

Клетки масштабируют *in vitro* и высевают на биоматериал или смешивают с ним, а затем переносят в поврежденную область, после чего в месте дефекта происходит восстановление хрящевой ткани.

Препарат Cartigrow (Regrow Biosciences), предназначенный для восстановления хрящевой колленного, плечевого, голеностопного, локтевого и лучезапястного суставов, содержит аутологичные хондроциты и фибриновый гель, что способствует равномерному распределению клеток при имплантации и помогает их прикреплению к тканям в области дефекта хряща. Согласно данным КИ препарата у всех участников с повреждениями хряща колленного сустава (14 пациентов) отмечалось улучшение состояния хряща согласно результатам магнитно-резонансной томографии⁴² [28].

В 2016 г. FDA был одобрен препарат тканевой инженерии MACI (Vericel Corporation) для лечения одиночных или множественных дефектов хряща колленного сустава у взрослых, представляющий собой аутологичные культивированные хондроциты на резорбируемой мембране из свиного коллагена I/III типа. По результатам КИ препарата у пациентов с очаговым дефектом хряща III или IV степени на медиальной мыщелке, латеральном мыщелке и/или блоке бедренной кости происходило улучшение состояния как минимум на 10 баллов по шкале оценки исхода травмы и остеоартроза колленного сустава (knee injury and osteoarthritis outcome score, KOOS). Показатели были выше в группе с применением препарата MACI – 87,5% относительно группы сравнения – 68,1%⁴³.

Novocart 3D (Aesculap Biologics) – тканеинженерный препарат, изготовленный на основе культивированных аутологичных хондроцитов, адгезированных на трехмерном коллагеновом каркасе. Согласно инструкции по применению, каркас с клетками имплантируется в суставной хрящ колленного сустава после удаления его поврежденной части⁴⁴. Препарат Novocart 3D был одобрен в ЕС в 2003 г. и с тех пор был использован для лечения более 18000 пациентов. В настоящее время продукт проходит КИ фазы 3 в США.

В декабре 2023 г. в Российской Федерации был зарегистрирован первый биомедицинский клеточный продукт Изитенс® (АО «ГЕНЕРИУМ»)⁴⁵, предназначенный для восстановления

повреждений хрящевой ткани колленного сустава площадью до 10 см². Продукт Изитенс® представлен сфероидными аутологичными хондроцитами, которые имплантируют в место дефекта хрящевой ткани, в результате чего хондроциты заполняют площадь дефекта компонентами гиалинового матрикса, оказывая регенеративный эффект. В проведенном КИ с участием 104 пациентов с повреждением хряща колленного сустава III или IV степени по классификации Международного общества по вопросам восстановления хрящевой ткани (International Cartilage Repair Society, ICRS) была выполнена трансплантация продукта Изитенс® с помощью артроскопии или мини-артротомии. Показаны высокая эффективность и безопасность использования препарата. Результаты контрольной артроскопии с биопсией, проведенной через 12 мес. после лечения препаратом, продемонстрировали значительное восстановление хряща у всех пациентов, которое соответствовало II степени по классификации ICRS (почти нормальное состояние).

Таким образом, появившиеся за последнее время на рынке многочисленные препараты клеточной терапии и тканевой инженерии и их высокая эффективность свидетельствуют о значительном потенциале данного направления.

Большое место среди данных препаратов занимают препараты на основе МСК, что обусловлено высоким регенеративным потенциалом данного типа клеток. В поврежденных тканях МСК секретируют цитокины для их восстановления, включая антиапоптотические, противовоспалительные, иммуномодулирующие, антифиброзные и ангиогенные агенты. Характерными свойствами МСК, определяющими их терапевтический эффект, являются способность к самообновлению и потенциал к многолинейной дифференциации. Помимо мезодермальных клеток (адипоциты, фибробласты, миоциты, остеоциты, хондроциты) МСК могут дифференцироваться в клетки эктодермального и энтодермального происхождения (нейрональные клетки, кардиомиоциты, гепатоциты, эндокринные панкреатические и эпителиальные клетки), что обуславливает разработку целого спектра препаратов для лечения различных нозологий: остеоартрит, болезнь Крона, боковой амиотрофической склероз, повреждения спинного мозга и др. [29, 30].

⁴² <https://www.regrow.in/cartigrow-for-cartilage-damage>

⁴³ <https://www.fda.gov/media/101914/download?attachment>

⁴⁴ <https://bonezonepub.com/2019/03/06/aesculap-biologics-announces-novocart-3d-trial-enrollment-milestone/>
<https://www.aesculapbiologics.com/en/patients/novocart-3d.html>

⁴⁵ <https://www.generium.ru/products/izitens/?ysclid=lwhk9in46k33459331>

В настоящее время проводится множество доклинических и клинических исследований МСК, предназначенных для лечения различных патологий, включая заболевания сердечно-сосудистой системы, костной и хрящевой ткани, диабет, последствия инсульта и нейродегенеративные заболевания, а также нозологии, опосредованные иммунными и воспалительными механизмами. Следует отметить, что терапевтический потенциал МСК в лечении онкологических заболеваний до конца не изучен – в проведенных исследованиях показано, что МСК могут как способствовать онкогенезу, так и подавлять развитие опухоли [13, 18, 31].

В настоящее время одобрено несколько препаратов МСК, полученных из пуповинной крови, для лечения ряда онкогематологических заболеваний: острый лейкоз (острый лимфобластный и острый миелобластный лейкозы), хронический лейкоз (хронический лимфоцитарный лейкоз и хронический миелоидный лейкоз), лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома Беркитта, а также для лечения миелодиспластических синдромов и нарушений пролиферации клеток крови (различные типы анемий, в том числе серповидно-клеточная анемия и синдром Ди Джорджи; наследственные заболевания иммунной системы, в том числе нейтропения)⁴⁶.

Для лечения гематологических заболеваний неонкогенной природы (серповидно-клеточная анемия и β -талассемия) наиболее перспективным является применение препаратов на основе ГСК пациента, генетически модифицированных с помощью технологии CRISPR/Cas9 (таких как Casgevy) [25]. Аспекты безопасности при использовании препаратов, модифицированных с помощью технологии редактирования генома, интенсивно исследуются в настоящее время в связи с возможностью обнаружения ряда нежелательных эффектов, в том числе «нецелевого редактирования», которое может привести к онкогенезу [32]. При рассмотрении FDA регистрационного досье на препарат Casgevy одним из основных проблемных вопросов было изучение вероятности «нецелевого редактирования» генов и риска онкогенности. Итоговое заключение FDA подтвердило соответствие терапии стандартам эффективности и безопасности, тем не менее компании-разработчику рекомендована долгосрочная тщательная оценка безопасности препарата, в связи с чем это включено в долгосрочный план мониторинга пациентов в течение следующих 15 лет для изучения

побочных эффектов разработанного препарата и поиска путей решения описанных проблем⁴⁷.

Для препаратов на основе лентивирусного вектора возможен риск инсерционного мутагенеза. Так, в инструкции по применению препарата Lyfgenia указано, что основные риски лечения включают гематологические злокачественные новообразования и инсерционный мутагенез. Однако проведенные исследования показали низкий мутагенный потенциал используемой в составе препарата конструкции BV305 по сравнению с лентивирусными векторами положительного контроля, кроме того, не было выявлено повышения риска клонально-го гемопоэза и появления лейкозных клеток⁴⁸.

При лечении ряда гематологических злокачественных новообразований основным инструментом клеточной терапии являются генетически модифицированные лимфоциты с химерным антигенным рецептором (CAR-T и CAR-NK), способные избирательно распознавать антигены опухоли и уничтожать злокачественные клетки [19, 23]. Однако возможности применения данных клеточных продуктов при лечении солидных опухолей ограничены. Следует выделить значимые проблемы при использовании этого вида терапии, заключающиеся в сниженном уровне экспрессии опухолевых антигенов-мишеней и ингибировании функциональной активности CAR-T и CAR-NK клеток под влиянием иммуносупрессивного эффекта опухолевых клеток. Для решения этих проблем перспективными являются следующие подходы: создание универсальных рецепторов CAR, способных в ходе иммунотерапии к распознаванию различных таргетных антигенов; повышение функциональной активности CAR-T и CAR-NK клеток в условиях иммуносупрессивных эффектов опухолевого микроокружения [23, 31].

Разработанные к настоящему времени препараты клеточной терапии на основе ЛСК для лечения повреждений эпидермиса (ожоги и травмы) и роговицы глаза (ожоги, травмы, дистрофические поражения), а также препараты тканевой инженерии, направленные, главным образом, на регенерацию тканей опорно-двигательного аппарата (поражения костной ткани и хрящевой ткани суставов) позволили создать принципиально новый класс лекарственных средств для персонализированной терапии, имеющих значительные преимущества по сравнению с применением высокоинвазивных хирургических методов лечения, в том числе за счет

⁴⁶ <https://www.cordforlife.com/list-of-fda-approved-treatments/>

⁴⁷ <https://www.medpagetoday.com/opinion/second-opinions/107793>

⁴⁸ <https://www.fda.gov/media/175250/download?attachment>

снижения послеоперационных рисков и осложнений, что значительно сокращает период восстановления пациентов и улучшает прогноз течения заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ сведений об одобренных лекарственных препаратах клеточной терапии и тканевой инженерии в Российской Федерации и мире. Данные аутологичные и аллогенные клеточные продукты могут содержать мезенхимальные стволовые клетки, лимбальные стволовые клетки, эпителиальные клетки, хондроциты, нативные или генетически модифицированные гемопоэтические стволовые клетки, генетически модифицированные лимфоциты (CAR-T, CAR-NK клетки) и другие типы клеток. В целом, наиболее интенсивно развиваются клеточные технологии, направленные на лечение онкологических, неврологических и сердечно-сосудистых заболеваний, а также повреждений хрящевой ткани, кожных покровов, спинного мозга и роговицы глаза.

Применение препаратов тканевой инженерии, в том числе с использованием биологических или синтетических полимеров, перспективно для заполнения пустот в поврежденных тканях, обеспечения их структурной поддержки и эффективной регенерации.

Представленный анализ данных продемонстрировал, что современные подходы к лечению с использованием препаратов клеточной терапии и тканевой инженерии позволяют избежать высокоинвазивных хирургических вмешательств, более эффективно восполнить дефекты различных тканей организма, сократить сроки регенерации по сравнению с хирургическими методами терапии.

Большинство одобренных препаратов клеточной терапии являются импортными. В связи с этим разработка аналогичных отечественных препаратов выступает приоритетной задачей российской системы здравоохранения, что будет способствовать повышению их доступности для пациентов с тяжелыми заболеваниями.

Литература/References

1. El-Kadiry AE, Rafei M, Shammar R. Cell therapy: types, regulation, and clinical benefits. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:756029. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.756029>
2. Han F, Wang J, Ding L, Hu Y, Li W, Yuan Z, et al. Tissue engineering and regenerative medicine: achievements, future, and sustainability in Asia. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:83. <https://doi.org/10.3389/fbioe>
3. O'Brien FJ, Duffy GP. Form and function in regenerative medicine: introduction. *J Anat*. 2015;227(6):705–6. <https://doi.org/10.1111/joa.12401>
4. Shumega AR, Pavlov YI, Chirinskaite AV, Rubel AA, Inge-Vechtomov SG, Stepchenkova EI. CRISPR/Cas9 as a mutagenic factor. *Int J Mol Sci*. 2024;25(2):823. <https://doi.org/10.3390/ijms25020823>
5. Гринев ВВ, Посредник ДВ, Северин ИН, Потапнев МП. Генетическая модификация клеток человека с помощью лентивирусной трансдукции *in vitro* и *ex vivo*. Минск: БГУ; 2010. Grinev VV, Posrednik DV, Severin IN, Potapnev MP. *Genetic modification of human cells using lentiviral transduction in vitro and ex vivo*. Minsk: BSU; 2010 (In Russ.).
6. Wang Y, Yi H, Song Y. The safety of MSC therapy over the past 15 years: a meta-analysis. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):545. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02609-x>
7. Li C, Zhao H, Cheng L, Wang B. Allogeneic vs. autologous mesenchymal stem/stromal cells in their medication practice. *Cell Biosci*. 2021;11(1):187. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00698-y>
8. Conwit RA. Preventing familial ALS: a clinical trial may be feasible but is an efficacy trial warranted? *J Neurol Sci*. 2006;251(1–2):1–2. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.07.009>
9. Al-Chalabi A, Leigh PN. Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2000;13(4):397–405. <https://doi.org/10.1097/00019052-200008000-00006>
10. Oh KW, Noh MY, Kwon MS, Kim HY, Oh SI, Park J, et al. Repeated intrathecal mesenchymal stem cells for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2018;84(3):361–73. <https://doi.org/10.1002/ana.25302>
11. Honmou O, Yamashita T, Morita T, Oshigiri T, Hirota R, Iyama S, et al. Intravenous infusion of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in spinal cord injury patients: 13 case series. *Clin Neurol Neurosurg*. 2021;203:106565. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2021.106565>
12. Sakai D, Schol J, Foldager CB, Sato M, Watanabe M. Regenerative technologies to bed side: evolving the regulatory framework. *J Orthop Translat*. 2017;9:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2017.02.001>
13. Najjar M, Melki R, Khalife F, Lagneau L, Bouhtit F, Moussa Agha D, et al. Therapeutic mesenchymal stem/stromal cells: value, challenges and optimization. *Front Cell Dev Biol*. 2022;9:716853. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.716853>
14. Brockmann I, Ehrenpfordt J, Sturmheit T, Brandenburger M, Kruse C, Zille M, et al. Skin-derived stem cells for wound treatment using cultured epidermal autografts: clinical applications and challenges. *Stem Cells Int*. 2018;2018:4623615. <https://doi.org/10.1155/2018/4623615>
15. Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Меркулов ВА. Клинические исследования препаратов клеточной терапии: опыт рассмотрения зарубежными регуляторными органами. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020;22(2):139–50. Melnikova EV, Merkulova OV, Merkulov VA. Clinical trials for cellular therapy products: conclusions reached by foreign regulatory bodies. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2020;22(2):139–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-2-139-150>
16. Павлова ВЮ, Ливадный ЕС. Биотехнология CAR-T и новые возможности лечения опухолевых заболеваний. *Клиническая онкогематология*. 2021;14(1):149–56. Pavlova VYu, Livadnyi ES. CAR-T technology and new opportunities for tumor treatment. *Clinical Oncohematology*. 2021;14(1):149–56 (In Russ.). <https://doi.org/10.21320/2500-2139-2021-14-1-149-156>
17. Grissenberger S, Salzer B, Pascoal S, Wenninger-Weinzierl A, Lehner M, Distel M. Chapter 8 – Preclinical testing of CAR T cells in zebrafish xenografts. *Method Cell Biol*. 2022;167:133–47. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2021.07.002>
18. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J*. 2021;11(4):69. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
19. Гаврилина ОА, Галстян ГМ, Щекина АЕ, Котова ЕС,

- Масчан МА, Троицкая ВВ и др. Терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором взрослых больных В-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями. *Гематология и трансфузиология*. 2022;67(1):8–28. Gavrilina OA, Galstyan GM, Shchekina AE, Kotova ES, Maschan MA, Troitskaya VV, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy in adult patients with B-cell lymphoproliferative diseases. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2022;67(1):8–28 (In Russ.). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-67-1-8-28>
20. Gong Y, Klein Wolterink RGJ, Wang J, Bos GMJ, Germeeraad WTV. Chimeric antigen receptor natural killer (CAR-NK) cell design and engineering for cancer therapy. *J Hemat Oncol*. 2021;14(1):73. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01083-5>
21. Habib S, Tariq SM, Tariq M. Chimeric antigen receptor-natural killer cells: the future of cancer immunotherapy. *Ochsner J*. 2019;19(3):186–7. <https://doi.org/10.31486/toj.19.0033>
22. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *N Engl J Med*. 2021;384(3):252–60. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>
23. Киселева ЯЮ, Шишкин АМ, Иванов АВ, Кулинич ТМ, Боженко ВК. CAR-терапия солидных опухолей: перспективные подходы к модулированию противоопухолевой активности CAR-T-лимфоцитов. *Вестник РГМУ*. 2019;(5):5–13. Kiseleva YaYu, Shishkin AM, Ivanov AV, Kulich TM, Bozhenko VK. CAR T-cell therapy of solid tumors: promising approaches to modulating antitumor activity of CAR T cells. *Bulletin of RSMU*. 2019;(5):5–13 (In Russ.). <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2019.066>
24. Kwon SG, Kwon YW, Lee TW, Park GT, Kim JH. Recent advances in stem cell therapeutics and tissue engineering strategies. *Biomater Res*. 2018;22:36. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0148-4>
25. Паштаев НП, ред. *Современные методы диагностики и хирургического лечения кератоконуса*. Чебоксары; 2017. Pashtaev NP, ed. *Modern methods of diagnosis and surgical treatment of keratoconus*. Cheboksary; 2017 (In Russ.). EDN: IXHREG
26. Gibson ALF, Holmes JH 4th, Shupp JW, Smith D, Joe V, Carson J, et al. A phase 3, open-label, controlled, randomized, multicenter trial evaluating the efficacy and safety of StrataGraft® construct in patients with deep partial-thickness thermal burns. *Burns*. 2021;47(5):1024–37. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2021.04.021>
27. Heng CHY, Snow M, Dave LYH. Single-stage arthroscopic cartilage repair with injectable scaffold and BMAC. *Arthrosc Tech*. 2021;10(3):e751–6. <https://doi.org/10.1016/j.eats.2020.10.065>
28. Pathak S, Chaudhary D, Reddy KR, Acharya KKV, Desai SM. Efficacy and safety of CARTIGROW® in patients with articular cartilage defects of the knee joint: a four year prospective study. *Int Orthop*. 2022;46(6):1313–21. <https://doi.org/10.1007/s00264-022-0536>
29. Hmadcha A, Martin-Montalvo A, Gauthier BR, Soria B, Capilla-Gonzalez V. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:43. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00043>
30. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2014;100(9):1249–60. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09>
31. Howard D, BATTERY LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat*. 2008;213(1):66–72. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x>
32. Рачинская ОА, Мельникова ЕВ, Меркулов ВА. Актуальные направления и риски применения препаратов на основе технологий редактирования генома. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):247–61. Rachinskaya OA, Melnikova EV, Merkulov VA. Current trends and risks associated with the use of therapies based on genome editing. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):247–61 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-247-261>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Галицына** – сбор, анализ и интерпретация данных литературы; формулировка выводов исследования; написание и критический пересмотр текста рукописи; **Е.А. Куликова** – формулировка концепции и выводов исследования; **Ю.А. Павельев, О.С. Кузнецова, А.С. Сенина** – сбор и анализ данных литературы; **А.Б. Гусев** – обоснование теоретической и практической значимости работы; утверждение окончательного варианта 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. Galitsyna** collected, analysed, and interpreted literature; formulated the conclusions; drafted and critically revised the manuscript. **E.A. Kulikova** conceptualised the study and formulated the conclusions. **Yu.A. Pavelyev, O.S. Kuznetsova, A.S. Senina** collected and analysed literature. **A.B. Gusev** justified the theoretical and practical significance of the scientific work and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Галицына Елена Валерьевна, канд. биол. наук / **Elena V. Galitsyna**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2305-4936>

Куликова Екатерина Александровна / **Ekaterina A. Kulikova**

Павельев Юрий Александрович / **Yuriy A. Pavelyev**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2364-1137>

Кузнецова Ольга Сергеевна, канд. биол. наук / **Olga S. Kuznetsova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6319-6360>

Сенина Анна Сергеевна, канд. фарм. наук / **Anna S. Senina**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3524-4331>

Гусев Александр Борисович, канд. экон. наук / **Alexander B. Gusev**, Cand. Sci. (Econ.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9063-0601>

Поступила 16.11.2023

После доработки 29.05.2024

Принята к публикации 21.06.2024

Online first 05.07.2024

Received 16 November 2023

Revised 29 May 2024

Accepted 21 June 2024

Online first 5 July 2024

УДК 615.076.9:57.085:604

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-443-455>

Обзор | Review



Оценка специфической активности препаратов эритропоэтина: современное состояние

Л.А. Гайдерова, Н.А. Алпатова✉, С.Л. Лыскова, А.М. Гуськов, О.В. Головинская

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

✉ Алпатова Наталья Александровна; alpatova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Учитывая распространенность применения в клинической практике лекарственных препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) разных производителей, при оценке их качества по показателю «Специфическая активность» важно гарантировать то, что пациенты получают сопоставимые дозы препаратов. Для гармонизации подходов в определении специфической активности необходимо применение фармакопейных биологических методов анализа и соответствующих стандартных образцов (СО) – международных (МСО) и фармакопейных (ФСО).

ЦЕЛЬ. Обобщение сведений о фармакопейных требованиях к оценке специфической активности препаратов рчЭПО, об актуальных СО и биологических методиках (*in vivo* и *in vitro*) для оценки специфической активности рчЭПО, а также анализ соответствия требованиям нормативной документации на лекарственные средства рчЭПО, зарегистрированные в Российской Федерации.

ОБСУЖДЕНИЕ. Представлена информация об особенностях структуры молекул эритропоэтинов. Профиль гликозилирования, который обуславливает различия в периодах полувыведения и скорости биodeградации препаратов рчЭПО, главным образом влияет на специфическую биологическую активность данных препаратов. Приведены фармакопейные требования к биологическим методам оценки специфической активности *in vivo*. Обобщены сведения о СО, применяемых для определения активности. Отражены проблемы, связанные с разработкой биологических методик оценки специфической активности *in vitro*, и изучены возможности их включения в фармакопеи. Проведенный анализ методов определения специфической активности лекарственных средств на основе рчЭПО российского производства позволил заключить, что используемые методы не в полном объеме соответствуют установленным требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Выявлена необходимость разработки и аттестации национального фармакопейного СО для оценки специфической активности рчЭПО с целью обеспечения потребностей производителей российских препаратов в условиях импортозамещения. Для внедрения адекватных методов анализа при оценке качества рчЭПО в соответствии с принципом 3R необходима гармонизация подходов и создание единого документа, регулирующего проведение испытаний специфической активности препаратов рчЭПО.

Ключевые слова: лекарственные препараты эритропоэтина; рекомбинантный эритропоэтин человека; рчЭПО; эпоэтин; дарбэпоэтин; специфическая активность; фармакопейные требования; биологический метод *in vivo*; биологический метод *in vitro*; стандартный образец; принцип 3R

© Л.А. Гайдерова, Н.А. Алпатова, С.Л. Лыскова, А.М. Гуськов, О.В. Головинская, 2024

Для цитирования: Гайдерова Л.А., Алпатова Н.А., Лысикова С.Л., Гуськов А.М., Головинская О.В. Оценка специфической активности препаратов эритропоэтина: современное состояние. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(4):443–455. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-443-455>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).
Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Potency evaluation of erythropoietin products: current status

Lidia A. Gaiderova, Natalia A. Alpatova [✉], Svetlana L. Lysikova,
Alexander M. Guskov, Olga V. Golovinskaya

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

[✉] Natalia A. Alpatova; alpatova@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Given the widespread clinical use of recombinant human erythropoietin (rhEPO) products from different manufacturers, potency assays should ensure that patients receive comparable doses of rhEPO across medicinal products. The harmonisation of approaches to potency testing requires the use of pharmacopoeial bioassays and appropriate international/pharmacopoeial reference standards (RSs).

AIM. This study aimed to summarise information on pharmacopoeial requirements, relevant RSs, and bioassays (*in vivo* and *in vitro*) for the assessment of rhEPO potency, as well as to analyse the pharmacopoeial compliance of manufacturers' specifications for rhEPO products authorised in Russia.

DISCUSSION. This article presents information on the molecular structure of erythropoietin. The glycosylation profile of erythropoietin not only accounts for most of the differences in the half-life and biodegradation rate but also significantly influences the potency of rhEPO products. The authors outlined the pharmacopoeial requirements for potency assays *in vivo*, summarised the information on RSs for potency determination, characterised the development of potency assays *in vitro*, and studied the possibility of including *in vitro* assays in pharmacopoeias. The analysis showed that some potency assays used for rhEPO products manufactured in Russia did not comply with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

CONCLUSIONS. The study identified the need to develop and certify a national pharmacopoeial RS for the potency of rhEPO in order to satisfy the demands of Russian manufacturers in the context of import substitution. To implement adequate 3R-compliant methods for rhEPO quality assessment, it is necessary to harmonise approaches to potency testing of rhEPO products and develop a consolidated document governing such testing.

Keywords: erythropoietins; recombinant human erythropoietin; rhEPO; epoetin; darbepoetin; potency; pharmacopoeial requirements; *in vivo* assay; *in vitro* assay; reference standard; 3R principle

For citation: Gaiderova L.A., Alpatova N.A., Lysikova S.L., Guskov A.M., Golovinskaya O.V. Potency evaluation of erythropoietin products: current status. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):443–455. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-443-455>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Объем рынка биотехнологических лекарственных препаратов (ЛП) в Российской Федерации стабильно увеличивается в последние годы. Так, в 2022 г. в этом рыночном сегменте прирост составил 18,8% [1]. Препараты на основе рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) активно используются в клинической практике и входят в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения»¹. ЛП этой группы показаны при анемиях различного генеза, прежде всего у пациентов с хронической почечной недостаточностью, а также у пациентов с онкологическими заболеваниями при химиотерапии или больных СПИДом на фоне противовирусного лечения [2, 3].

Одним из основных показателей качества биотехнологических ЛП, в том числе рчЭПО, является специфическая активность. Оценка качества ЛП осуществляется с применением валидированных методик и соответствующих стандартных образцов (СО) как на этапе контроля в процессе производства, так и при проведении фармацевтической экспертизы. Правильность и прецизионность методов оценки специфической активности позволяют гарантировать терапевтическую эффективность применения ЛП [4, 5].

Большинство ЛП на основе рчЭПО, представленных на фармацевтическом рынке, являются биоаналогичными препаратами. Учитывая связь между биологической специфической активностью и клинической эффективностью, необходима гармонизация подходов к оценке специфической активности препаратов рчЭПО разных производителей. Для оценки активности целесообразно применять соответствующие СО – международные (МСО) или фармакопейные (ФСО), – и выражать активность в международных единицах (МЕ). Такой подход является инструментом регулирования при сопоставлении значений активности ЛП разных производителей, что необходимо для обеспечения качества и безопасности применения биоаналогичных ЛП.

Цель работы – обобщение сведений о фармакопейных требованиях к оценке специфической активности препаратов рчЭПО, об актуальных СО и биологических методиках (*in vivo* и *in vitro*) для оценки специфической активности рчЭПО, а также анализ соответствия требованиям нормативной документации на лекар-

ственные средства рчЭПО, зарегистрированные в Российской Федерации.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Структура и основные функции эндогенного эритропоэтина

Эритропоэтин (ЭПО) – гетерогенный гликопротеин, молекула которого содержит 165 аминокислотных остатков [6, 7]. Гликозилирование важно для проявления биологической активности ЭПО. Присутствие высокосиалированных гликановых структур оказывает влияние на период полувыведения *in vivo* и терапевтическую эффективность ЭПО [6, 8]. Существуют различные изоформы эндогенного ЭПО со структурными изменениями в четырех гликанах, что обеспечивает их разную биологическую активность [9].

Ген, кодирующий ЭПО человека, расположен в хромосоме 7 и предварительно транслируется в белок-предшественник, от которого далее удаляется сигнальный пептид и С-концевой аргинин и присоединяются углеводные цепи. В результате образуется гликопротеин с молекулярной массой 30–34 кДа, при этом от 35 до 45% молекулярной массы приходится на углеводные структуры, из которых 17% – на сиаловую кислоту [10]. ЭПО секретируется преимущественно почками. Молекула ЭПО стимулирует пролиферацию предшественников эритроидных клеток, а также их дифференцировку в зрелые эритроциты [11]. При достаточной оксигенации в почечных тканях мРНК ЭПО не обнаруживается, вероятно, из-за низкого уровня экспрессии гена. В условиях гипоксии транскрипция гена усиливается, и в течение 30 мин уровень мРНК может возрастать в 200 раз по сравнению с исходным. Увеличение продукции ЭПО способствует ускорению эритропоэза и повышению числа циркулирующих эритроцитов [12, 13].

На экспрессию гена ЭПО влияет фактор, индуцируемый гипоксией (*hypoxia-inducible factor*, HIF) – гетеродимер, состоящий из α - и β -субъединиц. Содержание белка HIF α определяется активностью фермента HIF-пролилгидроксилазы, снижение концентрации которой в условиях гипоксии способствует стабильности HIF α и увеличению транскрипции гена ЭПО, в результате чего при анемии продукция мРНК и синтез ЭПО быстро возрастают [14].

Биологическое действие ЭПО обусловлено взаимодействием активного центра молекулы

¹ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 23.11.2020 № 3073-р «О внесении изменений в распоряжение Правительства Российской Федерации от 12.10.2019 № 2406-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи».

со специфичными рецепторами на мембранах клеток-мишеней. Известны два типа рецепторов эритропоэтина (ЕпоR): гомодимер, состоящий из 484 аминокислот и одной углеводной цепи, и гетеродимер, включающий субъединицу ЕпоR и CD131 [2, 15]. Связывание ЭПО с мембранным рецептором ЕпоR запускает внутриклеточный механизм активации сигнального пути JAK2/STAT5, играющего основную роль в эритропоэзе [16, 17].

Механизм действия эритропоэтина

На биологическую активность ЭПО оказывает влияние период полувыведения молекулы, определяемый структурой ее углеводной части, особенно количеством остатков сиаловой кислоты на концах углеводных цепей [5]. Наличие сиаловых остатков влияет на фармакокинетику молекулы, замедляя ее деградацию и задерживая выведение из кровообращения [6, 18]. Углеводная часть молекулы гликопротеина и степень сиалирования играют важную роль в передаче различных физиологических сигналов клеткам-мишеням при связывании с мембранным рецептором. Десиалированный ЭПО обладает сильным сродством к ЕпоR и склонностью к быстрому рецептор-опосредованному захвату. Это объясняет его более короткий период полувыведения [19, 20] и более высокую активность *in vitro*, чем у интактного ЭПО [21, 22].

Фармакокинетика ЭПО также зависит от размера молекулы. В случае молекул меньшего размера происходит более быстрое удаление посредством клубочковой фильтрации [23, 24].

Таким образом, на биологическую активность препаратов рчЭПО главным образом влияет профиль гликозилирования, который обуславливает различия в периодах полувыведения и скорости биodeградации.

Лекарственные препараты эритропоэтина человека

Первый препарат рчЭПО был получен в середине 1980-х гг. и одобрен Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA)² в 1989 г. В России ЛП на основе рчЭПО применяются с начала 1990-х гг.

Высокая потребность в препаратах рчЭПО способствует росту числа биоаналогичных лекарственных средств (ЛС) данной группы. Однако разработка полностью идентичных рчЭПО разными производителями затруднена,

что связано с применением разных биотехнологических процессов получения белка, а также тем, что гликозилирование молекул ЭПО не в полной мере регулируется на генетическом уровне – даже при сходстве аминокислотной последовательности степень их гликозилирования может отличаться [25, 26]. Гликановый профиль влияет на фармакокинетику и эффективность препаратов рчЭПО, а также на иммуногенность [27, 28].

Иммуногенные свойства рчЭПО проявляются выработкой нейтрализующих антител как к эндогенному, так и к экзогенному ЭПО при продолжительной лекарственной терапии. Полное прекращение эритропоэза приводит к развитию у пациентов парциальной красноклеточной аплазии костного мозга – жизнеугрожающего состояния с показанием к частым трансфузиям эритроцитарной массы [29, 30].

Эпоэтин – международное непатентованное наименование (МНН) рчЭПО, который по аминокислотной последовательности, степени гликозилирования и механизму действия сходен с эндогенным ЭПО человека. В настоящее время известно о девяти видах эпоэтина (альфа, бета, гамма, дельта, ипсилон, каппа, омега, тета и зета), отличающихся профилем гликозилирования. Эпоэтины с модифицированной аминокислотной последовательностью, отличающейся и от эндогенного, и от рекомбинантного ЭПО, принято обозначать приставкой «дарб» [7].

В Российской Федерации зарегистрировано 14 ЛП на основе рчЭПО первого поколения как отечественного, так и зарубежного производства (табл. 1). ЛП рчЭПО отечественного производства в основном изготовлены из фармацевтических субстанций (ФС), внесенных в Государственный реестр лекарственных средств³. Также в реестр внесена одна ФС рчЭПО зарубежного производства.

С 2001 г. применяется ЛП рчЭПО второго поколения – дарбэпоэтин альфа. Для увеличения времени циркуляции в организме в аминокислотной последовательности молекулы было произведено пять замен, что привело к появлению двух дополнительных N-связанных гликанов. Следствием модификации является увеличение молекулярной массы, количества сиаловых кислот и величины отрицательного заряда, что обеспечивает более длительный период полувыведения дарбэпоэтина из плазмы (24 ч) по сравнению с препаратами рчЭПО (4–12 ч), и, как следствие, позволяет изменить

² Office of technology assessment, recombinant erythropoietin: payment options for medicare OTA-H-451. US Government Printing Office; 1990.

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

схему применения препарата – снизить дозу и увеличить период между введениями [6, 31].

Референтным препаратом дарбэпоэтина альфа является препарат Аранесп®. Срок действия патентов, защищающих его производство и продажу в Европейском союзе (ЕС), истекает, чем и обусловлена разработка и регистрация биоподобных препаратов данной группы [6]. В настоящее время в Российской Федерации зарегистрированы три биоаналогичных препарата на основе дарбэпоэтина альфа отечественного производства (Дарбэстим®, Эподарба®, Лонекса®)⁴.

В препарате рчЭПО третьего поколения (Мирцера®, метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтин бета) молекула эпоэтина бета через ε-аминогруппу группу лизина или N-концевую аминогруппу образует ковалентную связь с метоксиполиэтиленгликольбутановой кислотой. Это позволило увеличить молекулярную массу до 60 кДа, оставив неизменной белковую часть, что, в свою очередь, привело к понижению сродства активного центра молекулы ЭПО к мембранным рецепторам и пролонгации времени полувыведения (до 130 ч). Было показано, что в сравнении с эпоэтином бета конъюгат метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтин бета в исследованиях *in vivo* обладал большей биологической активностью, чем в опытах *in vitro* [32].

Качество ЛС на основе рчЭПО оценивается в соответствии с перечнем контролируемых

показателей, методов и норм, установленных региональными или национальными фармакопеями. Первые рчЭПО зарегистрированы до введения монографии Европейской фармакопеи (ЕФ)⁵ (в 2008 г.) и общей фармакопейной статьи (ОФС) Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)⁶ (в 2018 г.), в связи с чем нормативная документация (НД) только 65% ЛП данной группы (как российских, так и зарубежных), находящихся в обращении на территории России, полностью удовлетворяет требованиям регламентирующих документов. Приведение НД в соответствие с современными требованиями фармакопей гарантирует эффективность и безопасность ЛП, поступающих на фармацевтический рынок.

Оценка специфической активности рекомбинантного эритропоэтина человека в соответствии с фармакопейными требованиями

Биологический метод *in vivo*

Особенности фармакопейных методик оценки активности рчЭПО представлены в *таблице 2*.

Ранее для определения активности рчЭПО применяли методику, основанную на использовании мышей с полицитемией, индуцированной пониженным атмосферным давлением, а результаты оценивали по включению изотопа ⁵⁹Fe в эритроциты. Данная методика характеризуется

Таблица 1. Количество лекарственных средств на основе эпоэтинов, зарегистрированных в Российской Федерации
Table 1. Number of epoetin medicines approved in the Russian Federation

Международное непатентованное наименование <i>International non-proprietary name</i>	Российское производство <i>Manufactured in Russia</i>		Иностранное производство <i>Manufactured abroad</i>	
	Фармацевтическая субстанция <i>Active substance</i>	Лекарственный препарат <i>Medicinal product</i>	Фармацевтическая субстанция <i>Active substance</i>	Лекарственный препарат <i>Medicinal product</i>
Эпоэтин альфа <i>Epoetin alpha</i>	1	2	–	3
Эпоэтин бета <i>Epoetin beta</i>	2	4	–	1
Эпоэтин тета <i>Epoetin theta</i>	–	–	–	1
Дарбэпоэтин альфа <i>Darbepoetin alpha</i>	–	3	–	1
Метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтин бета <i>Methoxy-polyethylene glycol-epoetin beta</i>	–	–	–	1

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. «–» – не зарегистрирован в Российской Федерации.
Note. –, not approved in the Russian Federation.

⁴ Там же.

⁵ 07/2021:1316 Erythropoietin concentrated solution. European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2023.

⁶ ОФС.1.2.4.0017.18 Определение специфической активности препаратов эритропоэтина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 2. Фармакопейные требования и особенности определения специфической активности лекарственных средств на основе эритропоэтина с использованием биологического метода *in vivo*
Table 2. Pharmacopoeial requirements for, and particulars of, determining the potency of erythropoietin medicines using *in vivo* assays

Методика <i>Procedure</i>	Основные особенности методики <i>Main assay particulars</i>	Фармакопейные требования <i>Pharmacopoeia requirements</i>					
		Европейская фармакопея ⁷ <i>European Pharmacopoeia</i> ⁷	Индийская фармакопея ⁸ <i>Indian Pharmacopoeia</i> ⁸	Фармакопея США ⁹ <i>United States Pharmacopoeia</i> ⁹	ГФ РФ ¹⁰ <i>State Pharmacopoeia of the Russian Federation</i> ¹⁰	Китайская фармакопея ¹¹ <i>Pharmacopoeia of the People's Republic of China</i> ¹¹	Японская фармакопея ¹² <i>Japanese Pharmacopoeia</i> ¹²
Оценка активности по включению изотопа ⁵⁹ Fe в эритроциты полицитомических мышей <i>Activity estimation by the incorporation of ⁵⁹Fe into erythrocytes of polycythaemic mice</i>	Активность, % (95% доверительный интервал) <i>Potency, % (95% confidence interval)</i>	80–125 (от 64 до 156) <i>(from 64 to 156)</i>					
	Дозы, МЕ/мл <i>Doses, IU/mL</i>	0,05; 0,1; 0,2					
	Количество мышей <i>Number of mice</i>	6					
Оценка активности по влиянию на ретикулопоэз нормоцитомических мышей <i>Activity estimation by the effect on reticulocyte production in normocythaemic mice</i>	Активность, % (95% доверительный интервал) <i>Potency, % (95% confidence interval)</i>		80–125 (от 64 до 156) <i>(from 64 to 156)</i>		80–140		–
	Дозы, МЕ/мл <i>Doses, IU/mL</i>		20; 40; 80		10; 20; 40		10–40 5; 10; 20
	Количество мышей <i>Number of mice</i>		8		4		5

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации; «–» – отсутствие в фармакопее.
Note. –, not present in the pharmacopoeia.

⁷ 07/2021:1316 Erythropoietin concentrated solution. European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2023.

⁸ Erythropoietin concentrated solution. Indian Pharmacopoeia. 9th ed. Vol. 3; 2022.

⁹ General Chapter 124 Erythropoietin bioassays. USP46–NF41; 2023.

¹⁰ ОФС.1.2.4.0017.18 Определение специфической активности препаратов эритропоэтина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹¹ General Chapter 3522 *In vivo* test for biological activity of human erythropoietin. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Vol. 3; 2020.

¹² Epoetin alfa (Genetical recombination). Japanese Pharmacopoeia. 18th ed.; 2021.

чувствительностью, точностью и специфичностью, однако ее применение ограничивается необходимостью использования гипобарической камеры и радиоизотопов [5].

В настоящее время при определении активности рчЭПО наиболее широко применяется анализ, основанный на оценке уровня пролиферации ретикулоцитов у мышей с нормоцитемией. Ответ на введение ЛП оценивается в сравнении с СО. Протокол предполагает однократное (реже многократное) введение рчЭПО нормоцитемическим мышам с отбором крови на 5 сут и подсчетом количества ретикулоцитов с помощью проточной цитометрии [33, 34]. При анализе НД на препараты рчЭПО разных производителей установлено, что в случае 11 препаратов из 14 (79%) использовался именно этот метод для оценки специфической активности. В случае 60% препаратов рчЭПО российских производителей специфическая активность оценивается согласно требованиям ГФ РФ¹³.

В соответствии с методикой, описанной в ЕФ¹⁴, мышам линии В6D2F1 вводят по 0,5 мл одной из трех доз ЛП или биологического СО эритропоэтина (Biological Reference Preparation for erythropoietin, BRP) однократно подкожно. На каждую дозировку предусмотрена группа из 8 особей. Через 96 ч проводят отбор крови. Образцы окрашивают с использованием флуоресцентного красителя (тиазоловый оранжевый) и определяют количество ретикулоцитов с помощью проточной цитометрии. На основании полученных данных рассчитывают активность препарата, которая должна находиться в пределах от 80 до 125% от заявленной (95% доверительный интервал от 64 до 156%). Схожие требования установлены Британской¹⁵ и Индийской¹⁶ фармакопеями, а также фармакопеей США¹⁷. Следует отметить, что в Китайской фармакопее¹⁸ нет указания на конкретный СО.

Требования ГФ РФ¹⁹ к определению активности препаратов рчЭПО согласуются с рекомендованными выше, при этом указана возможность использования нескольких линий мышей (В6D2F1, гибриды F1 (СВА×С57BL/6), ВАLВ/с), а в качестве красителя – акридиновый оранжевый.

Отмечаются различия в требованиях национальных фармакопей некоторых стран к оценке активности рчЭПО. Так, например, в Японской фармакопее²⁰ представлены отдельные монографии для эпоэтинов альфа и бета (табл. 2). Согласно методике препараты вводят по 0,2 мл ежедневно в течение 3 сут и после отбора крови на 4 сут подсчитывают количество эритроцитов с помощью счетчика клеток крови. Специфическую активность выражают в ЕД/мг белка.

Биологический метод *in vitro*

Применение метода *in vitro* допустимо только в случае получения сопоставимых результатов при определении активности двумя методами: с использованием животных и культур клеток, чувствительных к ЭПО.

Так, специфическая активность зарегистрированных²¹ в Российской Федерации препаратов Эпрекс® (эпоэтин альфа) и Аранесп® (дарбэпоэтин альфа) определяется биологическим методом *in vitro* – по оценке влияния (по сравнению с соответствующим СО) на пролиферативную активность клеток линии УТ-7 и генную экспрессию на клетках линии УТ7-9. Активность биоаналогичных препаратов дарбэпоэтина альфа российских производителей оценивается и *in vivo* на нормоцитемических мышах (Дарбэстим®) и *in vitro* (Эподарба® и Лонекса® ПСК).

Следует отметить, что с учетом особенностей молекулы рчЭПО, обусловленных наличием нескольких изоформ, обладающих различной фармакокинетикой и проявляющих в условиях *in vivo* и *in vitro* разную активность, имеются трудности с разработкой и валидацией метода анализа *in vitro*, применимого для всех препаратов рчЭПО [35].

Подходы к разработке фармакопейных методик *in vitro* для оценки активности рекомбинантного эритропоэтина человека

Биологические методики являются обязательными при контроле качества биотехнологических препаратов, если их эффективность не может быть адекватно подтверждена

¹³ ОФС.1.2.4.0017.18 Определение специфической активности препаратов эритропоэтина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁴ 07/2021:1316 Erythropoietin concentrated solution. European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2023.

¹⁵ Erythropoietin concentrated solution. British Pharmacopoeia. Vol. 1; 2020.

¹⁶ Erythropoietin concentrated solution. Indian Pharmacopoeia. 9th ed. Vol. 3; 2022.

¹⁷ General Chapter 124 Erythropoietin bioassays. USP46–NF41; 2023.

¹⁸ General Chapter 3522 *In vivo* test for biological activity of human erythropoietin. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Vol. 3; 2020.

¹⁹ ОФС.1.2.4.0017.18 Определение специфической активности препаратов эритропоэтина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁰ Official Monograph Epoetin alfa (Genetical recombination). Japanese Pharmacopoeia. 18th ed.; 2021.

²¹ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

физико-химическими методами²². Однако в настоящее время согласно международным требованиям к проведению доклинических исследований актуальным является соответствие принципу 3R («замена/улучшение/сокращение», «replacement/refinement/reduction») [36]: «замена» – замена исследований, проводимых на животных; «улучшение» – пересмотр условий исследования с целью более гуманного обращения с используемыми животными; «сокращение» – использование меньшего количества животных²³.

Европейским центром по валидации альтернативных методов (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM) было предложено включить тест на активность рчЭПО *in vitro* в дополнение к двум методам *in vivo*. Ожидалось, что результаты сравнительных исследований окажутся сопоставимыми и смогут продемонстрировать допустимость применения методик с использованием культур клеток вместо испытаний на мышах. Однако число проведенных экспериментов оказалось недостаточным и выводы были признаны необоснованными, в результате чего решение о включении альтернативного метода было отложено [37, 38]. Позже ECVAM были даны рекомендации исключить из ЕФ²⁴ метод А (испытания на полицитемических мышах), при этом метод В (испытания на нормоцитемических мышах) оставался единственным методом определения активности рчЭПО. Поскольку использование большого числа животных в процессе валидации лабораториями альтернативного метода было сочтено недопустимым, оставлены оба метода *in vivo* до тех пор, пока не будет разработан адекватный метод *in vitro* для их замены [37].

Необходимость разработки альтернативного биологического метода оценки специфической активности препаратов рчЭПО отражена и в Фармакопее США²⁵, согласно которой требуется подтверждение сопоставимости результатов, полученных методами *in vivo* и *in vitro*.

Отсутствие альтернативного теста *in vitro* не исключает возможности использования валидированных согласно принципу 3R методов, разработанных для отдельных препаратов, при условии, что они одобрены регуляторным органом²⁶.

Следует отметить, что методики *in vitro* имеют ряд ограничений. Так, оценка связывания ЭПО

с рецептором с использованием иммуноферментного анализа, а также методика изучения аффинности выявляют только параметры связывания молекулы ЭПО. Разработка методик исследования механизма действия ЭПО с помощью клеток различных линий (32D, NFS-60, TF-1, UT-7 и UT-7/EPO) является длительным процессом [39].

Поиск подходящих для биологических методов *in vitro* модельных клеточных линий в настоящее время продолжается. Так, в испытании с применением ЭПО-зависимой клеточной линии AS-E2 человека, чувствительной к степени сиалирования молекул ЭПО, получены данные, коррелирующие с результатами оценки активности препарата рчЭПО на полицитемических мышах *in vivo* [40]. В других исследованиях показана возможность использования клеточной линии TF-1 при изучении биологической активности рчЭПО, экспрессированного в *Escherichia coli*, в сравнении с рчЭПО, получаемым с помощью классической эукариотической системы [41], а также при сопоставлении и количественной оценке активности препаратов с различным уровнем гликозилирования [42].

Для определения биологической активности ряда ЛП в последнее время все чаще используется анализ экспрессии репортерного гена из-за простоты, надежности и высокой эффективности метода. Для подтверждения механизма действия ЛП должна быть установлена и оценена связь между событиями, индуцируемыми введением препарата (передача сигнала, экспрессия генов, изменение клеточного фенотипа). Специфическая корреляция между уровнем экспрессии люциферазы и изменениями фенотипа является обоснованием отражения механизма действия ЛП, оцениваемого с помощью анализа экспрессии репортерного гена [43].

Известно, что ЭПО активирует несколько сигнальных путей, включая JAK2/STAT5. После связывания ЭПО с рецептором происходят конформационные изменения рецептора, приводящие к активации янус-киназы 2 (JAK2) и фосфорилированию индуктора транскрипции STAT5. Белок STAT5 связывается с SIE и GAS, инициируя экспрессию генов-мишеней, что приводит к индукции эритропоэза [44]. Отмечено, что активация пути JAK2/STAT5 напрямую коррелирует с биологической активностью ЭПО [45].

²² ICH Q6B Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. CPMP/ICH/365/96. EMA; 1999.

²³ Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches (EMA/CHMP/CVMP/JEG-3Rs/450091/2012). EMA; 2016.

²⁴ 07/2021:1316 Erythropoietin concentrated solution. European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2023.

²⁵ General Chapter 124 Erythropoietin bioassays. USP46–NF41; 2023.

²⁶ Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches (EMA/CHMP/CVMP/JEG-3Rs/450091/2012). EMA; 2016.

Метод оценки специфической активности ЭПО с помощью анализа экспрессии репортерного гена продемонстрировал прецизионность и достоверность определения показателей и преимущества по сравнению с исследованием ретикулоцитов *in vivo*, включая более высокую воспроизводимость и меньшую вариабельность [39].

Стандартные образцы, используемые при оценке активности препаратов эритропоэтина

Оценка специфической биологической активности должна проводиться относительно стабильного и хорошо охарактеризованного референтного образца, содержащего то же активное вещество, что и ЛП. С этой целью многие испытательные лаборатории разрабатывают «внутренние» биологические СО для конкретного активного белка. Однако это может быть сопряжено с проблемой, заключающейся в существовании различных единиц биологической активности для одного и того же активного белка и представлению значений активности в несопоставимых единицах. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) проводит утверждение международных СО (МСО) с установленной активностью в соответствующих единицах, что позволяет обеспечить достоверное и надежное сопоставление результатов, полученных в разных лабораториях [18]. Национальный институт биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) выполняет важную роль в разработке кандидатов в МСО биологических ЛП, в том числе для ЭПО. После утверждения МСО и присвоения ему значения активности в МЕ на ампулу образцы применяют для аттестации «внутренних» рабочих СО лабораторий, которые, в свою очередь, используются в повседневной практике для калибровки оборудования, проверки пригодности систем и методов, демонстрации сходства между сериями и между различными препаратами [18, 46]. Такая стратегия способствует экономии запасов МСО.

Один из первых СО ЭПО (Erythropoietin Standard A, ESA) был получен из плазмы крови овец и имел активность 10 ЕД/ампула. Следующий СО (Erythropoietin Standard B, ESB) представлял собой человеческий эндогенный

ЭПО, выделенный из мочи пациентов, и его активность составляла 10 ЕД/ампула относительно ESA. В 1964 г. ВОЗ одобрил данный образец в качестве МСО эритропоэтина (International Reference Preparation of Erythropoietin, IRPE) [47, 48]. В 1971 г. на основании результатов межлабораторных сравнительных исследований относительно IRPE был одобрен Второй МСО эритропоэтина человеческого уринарного для биоанализа (Second International Reference Preparation of Erythropoietin, 2nd IRP) с активностью 10 МЕ/ампула [49].

С появлением препаратов на основе рчЭПО в соответствии с процедурами, рекомендованными ВОЗ, были аттестованы и утверждены МСО рекомбинантного эпоэтина альфа, которые широко используются для определения специфической активности биологическим методом *in vivo*.

В 1990 г. Экспертный комитет по биологической стандартизации (Expert Committee on Biological Standardization) ВОЗ утвердил СО с кодом NIBSC 87/684²⁷ в качестве МСО рчЭПО с активностью 86 МЕ/ампула. По результатам межлабораторных исследований (26 лабораторий в 11 странах) было рекомендовано применять отдельные СО для эндогенного уринарного эритропоэтина и для рчЭПО, так как были выявлены различия между ними [50]. Также были охарактеризованы три кандидата в МСО, один из которых (код 88/574) в 2003 г. был утвержден²⁸ в качестве второго МСО рчЭПО (Second WHO International Standard for Erythropoietin, Human Recombinant, 2nd IS)²⁹ с активностью 120 МЕ/ампула с уточнением, что эта активность может оказаться непригодной для других видов анализа, кроме *in vivo*. Позже второй МСО рчЭПО был заменен на новый СО, аттестованный на основании отчета о результатах международных сравнительных испытаний относительно второго МСО с участием 15 экспертных лабораторий из 7 стран³⁰.

В 2012 г. ВОЗ кандидат с кодом NIBSC 11/170³¹ и активностью 1650 МЕ/ампула был рекомендован в качестве третьего МСО рчЭПО для биологических методов (Third International Standard for Erythropoietin, Recombinant, for Bioassay, 3rd IS), который в настоящее время является действующим³².

²⁷ Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches (EMA/CHMP/CVMP/JEG-3Rs/450091/2012). EMA; 2016.

²⁸ WHO Expert Committee on Biological Standardization, fifty-third report. WHO Technical Report Series, No. 926. WHO; 2003.

²⁹ WHO International Standard Erythropoietin, Human Recombinant NIBSC code: 88/574. <https://nibsc.org/documents/ifu/88-574.pdf>

³⁰ Burns C. WHO International Collaborative study of the proposed 3rd International Standard for Erythropoietin, recombinant, for bioassay (WHO/BS/2012.2195). WHO; 2012.

³¹ WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-third report. WHO Technical Report Series, No. 980. WHO; 2013.

³² https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/who_standards.aspx

Для определения специфической активности ЭПО биологическим методом *in vivo* согласно требованиям ЕФ³³ требуется применение биологического СО (Biological Reference Preparation for Erythropoietin, BRP). В 1997 г. был разработан первый стандартный образец BRP, состоявший из равных количеств эпоэтина альфа и эпоэтина бета (50:50), а возможность его применения и для физико-химических, и для биологических методов анализа была обусловлена отсутствием в его составе стабилизатора белковой природы [51, 52].

В 2003 г. Европейским директором по качеству лекарственных средств (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, EDQM) был утвержден биологический СО эритропоэтина серии 2 (BRP2). В международных сравнительных исследованиях с участием 14 лабораторий была подтверждена преемственность между BRP1 и BRP2, присвоена активность 32500 Ед/флакон, а также доказана пригодность образца для стандартизации биологических и физико-химических методов анализа, включая капиллярный зональный электрофорез, электрофорез в полиакриламидном геле, иммуноблоттинг, пептидное картирование, эксклюзионную хроматографию [51]. В ходе аттестации образца было отмечено, что при калибровке BRP2 по второму МСО значение активности было систематически выше заявленных в предыдущем межлабораторном исследовании, в связи с чем было рекомендовано назначить активность BRP3 по BRP2, чтобы гарантировать преемственность единиц между последовательными сериями BRP. В 2007 г. образец был утвержден в качестве биологического СО эритропоэтина серии 3 (BRP3) с активностью 35280 МЕ/флакон [53]. Для уменьшения частоты обновления серий СО EDQM было принято решение о разделении назначения образцов и создании в 2014 г. химического СО эритропоэтина (Erythropoietin for Physicochemical Tests, Chemical Reference Substance, CRS), предназначенного исключительно для физико-химических методов оценки качества препаратов рчЭПО [52, 54]. В 2014 г. утверждена четвертая серия BRP (BRP4) с активностью 13000 МЕ/флакон, которая предназначалась для биологических методов анализа на полицитемических и нормоцитемических

мышцах [55]. В 2018 г. для использования *in vivo* была утверждена пятая серия биологического СО (BRP5) с активностью 2000 МЕ/флакон, действующая в настоящее время [56].

В связи с истечением срока действия патентов на дарбэпоэтин альфа ожидалось появление биоподобных препаратов этой группы. В связи с этим в 2020 г. был разработан, изучен в межлабораторных исследованиях и утвержден первый МСО дарбэпоэтина с кодом 17/204 и активностью 100000 МЕ/ампула, предназначенный для оценки активности препаратов дарбэпоэтина *in vitro* [57].

Обобщенная информация о международных и региональных СО рчЭПО для определения специфической биологической активности представлена в *таблице 3* (опубликована на сайте журнала³⁴). В Британской³⁵ и Индийской³⁶ фармакопеях, а также в фармакопее США³⁷ в качестве СО рчЭПО указаны BRP, СО фармакопее США (United States Pharmacopoeia Reference Standard, USP RS) и СО Индийской фармакопее (Indian Pharmacopoeia Reference Standard, IPRS) соответственно. В Китайской Фармакопее³⁸ нет указания на конкретный СО, однако в отчете ВОЗ³⁹ упоминается, что в 2012 г. проводились сравнительные исследования Китайского национального вторичного СО эритропоэтина с вторым и третьим МСО.

Следует отметить, что в Российской Федерации также проводились разработки СО эпоэтинов альфа и бета, однако сроки их действия в настоящее время истекли [52].

Утвержденные МСО, являясь инструментами поддержания качества, способствуют расширению рынка биоподобных препаратов рчЭПО. Однако в условиях санкционных ограничений их доступность в Российской Федерации резко снизилась. В данных обстоятельствах на первый план выходят задачи по разработке национальных фармакопейных СО для контроля качества биотехнологических препаратов, в том числе рчЭПО [58].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного анализа нормативных документов на зарегистрированные в России препараты рекомбинантного эритропоэтина человека показано, что специфическая активность не всех лекарственных средств

³³ 07/2021:1316 Erythropoietin concentrated solution. European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2023.

³⁴ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-443-455-table3>

³⁵ Erythropoietin concentrated solution. British Pharmacopoeia. Vol. 1; 2020.

³⁶ Erythropoietin concentrated solution. Indian Pharmacopoeia. 9th ed. Vol. 3; 2022.

³⁷ General Chapter 124 Erythropoietin bioassays. USP46-NF41; 2023.

³⁸ General Chapter 3522 *In vivo* test for biological activity of human erythropoietin. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Vol. 3; 2020.

³⁹ WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-third report. WHO Technical Report Series, No. 980. WHO; 2013.

данной группы оценивается биологическим методом *in vivo* в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации. Для стандартизации методик и унификации единиц оценки специфической биологической активности рчЭПО необходимо применение международных стандартных образцов. Однако в условиях санкционных ограничений их доступность снизилась, что определяет необходимость разработки и утверждения внутренних стандартных образцов, аттестованных по международным. Отсутствие в России фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности рчЭПО обуславливает важность его разработки и аттестации с целью обеспечения потребностей производителей российских препаратов в условиях импортозамещения.

Учитывая современные тенденции к сокращению использования животных при проведении различных исследований, в том числе и при экспертизе качества лекарственных средств, в настоящее время изучаются возможности разработки и внедрения адекватных методов анализа *in vitro*, позволяющих свести к минимуму использование животных согласно принципу 3R (replacement/refinement/reduction), однако переход к его применению при оценке качества рчЭПО представляет собой настоящее время трудно реализуемую задачу. В связи с этим необходима гармонизация подходов для создания единого документа, регулирующего проведение исследований специфической активности препаратов рчЭПО в соответствии с принципом 3R.

Литература/References

1. Халимова АА, Орлов АС, Таубэ АА. Анализ локализации производства биотехнологических лекарственных препаратов в России с учетом происхождения активных фармацевтических субстанций. Биотехнологические лекарственные препараты. *Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(1):54–61. Khalimova AA, Orlov AS, Taube AA. Analysis of biopharmaceutical manufacturing localisation in Russia considering the country of origin of active pharmaceutical ingredients. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(1):54–61 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-1-53-61>
2. Broxmeyer HE. Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. *J Exp Med*. 2013;210(2):205–8. <https://doi.org/10.1084/jem.20122760>
3. Толкушин АГ, Холownia-Волоскова МЭ, Завьялов АА, Лучинин ЕА. Обзор потребления лекарственных препаратов в рамках льготного лекарственного обеспечения пациентов с некоторыми злокачественными новообразованиями лимфатической и кроветворной ткани на территории г. Москвы в 2019 г. *Современная организация лекарственного обеспечения*. 2021;8(3):22–31. Tolkushin AG, Holownia-Voloskova ME, Luchinin EA, Zavyalov AA. Review of drug consumption within the framework of preferential drug provision for patients with certain malignant neoplasms of lymphatic and hematopoietic tissues in Moscow in 2019. *Modern Organization of Drug Supply*. 2021;8(3):22–31 (In Russ.). <https://doi.org/10.30809/solo.3.2021.3>
4. Волкова РА, Fadeikina OV, Ustinnikova OB, Sarkisyan KA, Movsesyants AA, Merkulov VA, Kosenko VV. Требования к материалам раздела по стандартным образцам, представляемым в досье на биологические лекарственные средства. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):7–20. Volkova RA, Fadeikina OV, Ustinnikova OB, Sarkisyan KA, Movsesyants AA, Merkulov VA, Kosenko VV. Requirements for the information on reference standards submitted in the dossier for biologicals. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):7–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-7-20>
5. Ramos AS, Schmidt CA, Andrade SS, Fronza M, Rafferty B, Dalmora SL. Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(11):1561–9. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2003001100014>
6. Cowper B, Hockley J, Partridge K, Ferguson J, Rigsby P, Burns Ch. The first World Health Organization International Standard for *in vitro* biological activity of darbepoetin. *Biologicals*. 2020;(63):33–8. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.12.004>
7. Меркулов ВА, Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК, Медуницын НВ. Препараты рекомбинантных эритропоэтинов и их характеристика. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2013;(3):4–11. Merkulov VA, Soldatov AA, Avdeeva ZH, Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, Medunitsyn NV. Recombinant erythropoietin preparations and their characteristics. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2013;(3):4–11 (In Russ.). EDN: [RDXVGT](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.035)
8. Tanaka T, Nangaku M. Recent advances and clinical application of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents. *Exp Cell Res*. 2012;318(9):1068–73. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.035>
9. Elliott S, Egrie J, Browne J, Lorenzini T, Busse L, Rogers N, et al. Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Exp Hematol*. 2004;32(12):1146–55. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.08.004>
10. Sasaki H, Bothner B, Dell A, Fukuda M. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol Chem*. 1987;262(25):12059–76. PMID: 3624248
11. Molineux G, Sinclair AM. Biology of erythropoietin. In: Elliott SG, Foote MA, Molineux G, eds. *Erythropoietins, erythropoietic factors, and erythropoiesis. Milestones in drug therapy*. Basel: Birkhäuser; 2009. P. 41–60. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8698-6_3
12. Jelkmann W. Physiology and pharmacology of erythropoietin. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(5):302–9. <https://doi.org/10.1159/000356193>
13. Bunn HF. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(3):a011619. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011619>
14. Moradi Z, Maali A, Shad JS, Farasat A, Kouchaki R, Moghadami M, et al. Updates on novel erythropoiesis-stimulating agents: clinical and molecular approach. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2020;36(1):26–36. <https://doi.org/10.1007/s12288-019-01170-1>
15. Варламова ОН, Червяковская ОД. Эритропоэтин и его биологическая роль. *Медицина. Теория и практика*. 2019;4(3):61–69. Varlamova ON, Chervyakovskaya OD.

- Erythropoietin and its biological role. *Medicine. Theory and Practice*. 2019;4(3):61–69 (In Russ.). EDN: [NWDVPG](https://doi.org/10.1134/S0026893322050089)
16. Иваненко КА, Прасолов ВС, Хабушева ЭР. Транскрипционный фактор Sp1 в регуляции экспрессии генов, кодирующих компоненты сигнальных путей MAPK, JAK/STAT и PI3K/Akt. *Молекулярная биология*. 2022;56(5):832–47. <https://doi.org/10.31857/S0026893322050081>
 - Ivanenko KA, Prassolov VS, Khabusheva ER. Transcription factor Sp1 in the expression of genes encoding components of MAPK, JAK/STAT, and PI3K/Akt signaling pathways. *Molecular Biology*. 2022;56(5):756–69. <https://doi.org/10.1134/S0026893322050089>
 17. Peng B, Kong G, Yang C, Ming Y. Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation. *Cell Death Dis*. 2020;11(2):79. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2276-8>
 18. Meager A. Measurement of cytokines by bioassays: theory and application. *Methods*. 2006;8(4):237–52. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.005>
 19. Moore E, Bellomo R. Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury. *Ann Intensive Care*. 2011;1(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-1-3>
 20. Takeuchi M, Takasaki S, Shimada M, Kobata A. Role of sugar chains in the *in vitro* biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 1990;265(21):12127–30. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38318-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38318-8)
 21. Dong YJ, Kung C, Goldwasser E. Receptor binding of asialoerythropoietin. *J Cell Biochem*. 1992;48(3):269–76. <https://doi.org/10.1002/jcb.240480307>
 22. Imai N, Higuchi M, Kawamura A, Tomonoh K, Oh-Eda M, Fujiwara M, et al. Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin: suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin *in vitro*. *Eur J Biochem*. 1990;194(2):457–62. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15639.x>
 23. Zimmermann H, Gerhard D, Hothorn LA, Dingermann T. An alternative to animal testing in the quality control of erythropoietin. *Pharmeur Bio Sci Notes*. 2011;2011(1):66–80. PMID: 21619857
 24. Misaizu T, Matsuki S, Strickland TW, Takeuchi M, Kobata A, Takasaki S. Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood*. 1995;86(11):4097–104. <https://doi.org/10.1182/blood.V86.11.4097.bloodjournal86114097>
 25. Hua S, Oh MJ, Ozcan S, Seo YS, Grimm R, An HJ. Technologies for glycomic characterization of biopharmaceutical erythropoietins. *Trends Anal Chem*. 2015;68:18–27. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.004>
 26. Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood*. 2001;98(13):3626–34. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.13.3626>
 27. Zhang P, Woen S, Wang T, Liau B, Zhao S, Chen C, et al. Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discovery Today*. 2016;21(5):740–65. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.01.006>
 28. Lamanna WC, Holzmann J, Cohen HP, Guo X, Schweigler M, Stangler Th, et al. Maintaining consistent quality and clinical performance of biopharmaceuticals. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18(4):369–79. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1421169>
 29. Susantad T, Fuanthong M, Tharakaraman K, Tit-Oon P, Ruchirawat M, Sasisekharan R. Modified recombinant human erythropoietin with potentially reduced immunogenicity. *Sci Rep*. 2021;11(1):1491. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80402-1>
 30. Петренко АА, Пивник АВ, Дудина ГА, Дубницкая МГ. Парциальная красноклеточная аплазия костного мозга в сочетании с тимомой. Обзор литературы и собственные данные. *Терапевтический архив*. 2019;91(7):121–6. Petrenko AA, Pivnik AV, Dudina GA, Dubnitskaya MG. Pure red cell aplasia of the bone marrow in combination with thymoma. A literature review and own data. *Therapeutic Archive*. 2019;91(7):121–6 (In Russ.). <https://doi.org/10.26442/00403660.2019.07.000326>
 31. Macdougall IC. Novel erythropoiesis stimulating protein. *Semin Nephrol*. 2000;20(4):375–81. PMID: 10928340
 32. Macdougall IC, Robson R, Opatrna S, Lioquier X, Pannier A, Jordan P, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and subcutaneous continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1(6):1211–5. <https://doi.org/10.2215/cjn.00730306>
 33. Barth T, Oliveira PR, D'Avila FB, Dalmora SL. Validation of the normocytic mice bioassay for the potency evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations. *J AOAC Int*. 2008;91(2):285–91. <https://doi.org/10.1093/jaoac/91.2.285>
 34. Яковлев АК, Гайдерова ЛА, Подкуйко ВН, Волкова РА, Алпатова НА, Олефир ЮВ. Изучение возможности гармонизации метода определения специфической активности рекомбинантных эритропоэтинов с требованиями Европейской фармакопеи. *Эталоны. Стандартные образцы*. 2016;(3):4–11. Yakovlev AK, Gayderova LA, Podkuiko VN, Volkova RA, Alpatova NA, Olefir YuV. The possibility of harmonizing the recombinant erythropoietin specific activity determination method with European Pharmacopoeia. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2016;(3):4–11 (In Russ.). EDN: [XHDFRJ](https://doi.org/10.1007/s10930-017-9704-3)
 35. Metta MK, Malkhed V, Tantravahi S, Vuruputuri U, Kunaparaju R. Development of an *in vitro* bioassay for recombinant human erythropoietin (rHuEPO) based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of sialic acid dependent microheterogeneity: UT-7 cell bioassay. *Protein J*. 2017;36(2):112–22. <https://doi.org/10.1007/s10930-017-9704-3>
 36. Obora S, Kurosawa T. Implementation of the three Rs in biomedical research – has the turn of the century turned the tide? *Altern Lab Anim*. 2009;37(2):197–207. <https://doi.org/10.1177/026119290903700209>
 37. Lang C, Kolaj-Robin O, Cirefice G, Taconet L, Pel E, Jouette S, et al. Replacement, reduction, refinement-animal welfare progress in European Pharmacopoeia monographs: activities of the European Pharmacopoeia Commission from 2007 to 2017. *Pharmeur Bio Sci Notes*. 2018;2018:12–36. PMID: 29845933
 38. Machado FT, Maldaner FP, Perobelli RF, Xavier B, da Silva FS, de Freitas GW, et al. Evaluation of an *in vitro* cell culture assay for the potency assessment of recombinant human erythropoietin. *Altern Lab Anim*. 2016;44(2):113–20. <https://doi.org/10.1177/026119291604400207>
 39. Yang Y, Zhou Y, Yu L, Li X, Shi X, Qin X, et al. A novel reporter gene assay for recombinant human erythropoietin (rHuEPO) pharmaceutical products. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;100:316–21. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.003>
 40. Liefoghe EC, Tiplady R, Gerson P, Lloyd P, Heath A, Bristow AF. A sialylation-sensitive cell-based *in vitro* bioassay for erythropoietin; incorporation of the galactose-binding *Erythrina crista-galli* lectin. *Biologicals*. 2005;33(3):161–7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2005.05.001>
 41. Jeong TH, Son YJ, Ryu HB, Koo BK, Jeong SM, Hoang P, et al. Soluble expression and partial purification of recombinant human erythropoietin from *E. coli*. *Protein Expr Purif*. 2014;95:211–8. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.01.001>
 42. Гаврилова НА, Черепушкин СА, Рыкалина НВ, Обухов ЮИ. Разработка метода определения биологической активности препаратов эритропоэтина *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(2):120–4. Gavrilova NA, Cherepushkin SA, Rykalina NV, Obukhov Yul. The development of a method for determining the biological activity of erythropoietin preparations *in vitro*. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(2):120–4 (In Russ.). EDN: [WAIVXP](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.003)
 43. Wang L, Yu Ch, Junzhi Wang J. Development of reporter gene assays to determine the bioactivity of biopharmaceuti-

- ticals. *Biotechnol Adv.* 2020;39:107466.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107466>
44. Shi Z, Hodges VM, Dunlop EA, Percy MJ, Maxwell AP, El-Tanani M, et al. Erythropoietin-induced activation of the JAK2/STAT5, PI3K/Akt, and Ras/ERK pathways promotes malignant cell behavior in a modified breast cancer cell line. *Mol Cancer Res.* 2010;8(4):615–26.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0264>
45. Ma R, Hu J, Huang C, Wang M, Xiang J, Li G. JAK2/STAT5/Bcl-xL signalling is essential for erythropoietin-mediated protection against apoptosis induced in PC 12 cells by the amyloid β -peptide A β 25–35. *Br J Pharmacol.* 2014;171(13):3234–45. <https://doi.org/10.1111/bph.12672>
46. Tu H, Carrick K, Potts R, Hasselberg M, Verdecia M, Burns C, et al. A reference standard for analytical testing of erythropoietin. *Pharm Res.* 2022;39(3):553–62.
<https://doi.org/10.1007/s11095-022-03213-1>
47. Camiscoli JF, Weintraub AH, Gordon AS. Comparative assay of erythropoietin standards. *Ann N Y Acad Sci.* 1968;149(1):40–5.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1968.tb15133.x>
48. Cotes PM, Bangham DR. The international reference preparation of erythropoietin. *Bull World Health Organ.* 1966;35(5):751–60. PMID: 5297809
49. Annable L, Cotes PM, Mussett MV. The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull World Health Organ.* 1972;47(1):99–112. PMID: 4538911
50. Storrington PL, Gaines Das RE. The international standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. *J Endocrinol.* 1992;134(3):459–84.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1340459>
51. Behr-Gross ME, Daas A, Bristow AF. Collaborative study for the establishment of erythropoietin BRP batch 2. *Pharmeuropa Bio.* 2004;(1):23–33. PMID: 15659283
52. Яковлев АК, Гайдерова ЛА, Алпатова НА, Лобанова ТН, Постнова ЕЛ, Юрчикова ЕИ и др. Изучение принципов стандартизации фармакологической активности препаратов рекомбинантных эритропоэтинов. *Эталонные. Стандартные образцы.* 2016;(1):8–20. Yakovlev AK, Gayderova LA, Alpatova NA, Lobanova TN, Postnova EL, Yurchikova EI, et al. Studying of the standardization principles of pharmacological activity of recombinant erythropoietin preparations. *Measurement Standards. Reference Materials.* 2016;(1):8–20 (In Russ.). EDN: [VXVOJIB](https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.12.004)
53. Behr-Gross ME, Daas A, Burns C, Bristow AF. Collaborative study for the establishment of erythropoietin BRP batch 3. *Pharmeuropa Bio.* 2007;(1):49–66. PMID: 18413137
54. Burns C, Bristow AF, Buchheit KH, Daas A, Wierer M, Costanzo A. Establishment of the Ph. Eur. erythropoietin chemical reference substance batch 1. *Pharmeuropa Bio Sci Notes.* 2015;2015:99–117. PMID: 26830161
55. Burns C, Bristow AF, Daas A, Costanzo A. Collaborative study for the establishment of erythropoietin BRP batch 4. *Pharmeuropa Bio Sci Notes.* 2015;2015:246–53. PMID: 26830170
56. Ferguson J, Burns CJ, Regourd E, Costanzo A. Collaborative study for the establishment of erythropoietin BRP batch 5. *Pharmeuropa Bio Sci Notes.* 2019;2019:27–33. PMID: 30880683
57. Cowper B, Hockley J, Partridge K, Ferguson J, Rigsby P, Burns C. The first World Health Organization International Standard for *in vitro* biological activity of darbepoetin. *Biologicals.* 2020;63:33–8.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.12.004>
58. Jelkmann W. Efficacy of recombinant erythropoietins: is there unity of international units? *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(5):1366–8. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp058>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Л.А. Гайдерова** – концепция и дизайн исследования, окончательное утверждение версии статьи для публикации; **Н.А. Алпатова** – идея исследования, написание текста рукописи, формулировка выводов исследования; **С.Л. Лыскова** – обобщение материалов исследования, интерпретация результатов; **А.М. Гуськов** – сбор данных литературы, оформление списка литературы, дизайн таблиц; **О.В. Головинская** – сбор, систематизация и обобщение данных литературы, дизайн таблиц.

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещена таблица 3.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-443-455-table3>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **L.A. Gaiderova** conceptualised and designed the study, and approved the final version of the manuscript for publication. **N.A. Alpatova** conceived the idea of the study, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **S.L. Lysikova** generalised the materials and interpreted the results of the study. **A.M. Guskov** collected literature data, prepared the list of references, and designed the tables. **O.V. Golovinskaya** collected, collated, and summarised data, and designed the tables.

Additional information. Table 3 is published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-443-455-table3>

Об авторах / Authors

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук / **Lidia A. Gaiderova**, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Алпатова Наталья Александровна, д-р биол. наук / **Natalia A. Alpatova**, Dr. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6807-508X>

Лыскова Светлана Леонидовна, канд. мед. наук / **Svetlana L. Lysikova**, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7864-8972>

Гуськов Александр Михайлович / **Alexander M. Guskov**
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4523-5316>

Головинская Ольга Вячеславовна, канд. мед. наук / **Olga V. Golovinskaya**, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6966-9859>

Поступила 31.07.2024

После доработки 10.10.2024

Принята к публикации 06.12.2024

Received 31 July 2024

Revised 10 October 2024

Accepted 6 December 2024



Анализ современных регуляторных требований к качеству живых бактериальных вакцин и перспективы их усовершенствования

Т.И. Немировская [✉], И.В. Касина, Н.В. Александрова, С.А. Алексеева

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

✉ Немировская Татьяна Ивановна; nemirovskaya@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Живые бактериальные вакцины (ЖБВ) разработаны для профилактики туберкулеза и особо опасных инфекций: чумы, туляремии, сибирской язвы и бруцеллеза. Высокая эффективность ЖБВ связана с имитацией естественной инфекции и обеспечивает надежную и длительную защиту организма. Несмотря на значительные отличия состава и назначения живых вакцин, а также видовой принадлежности производственных штаммов, подходы к экспертизе качества этой группы лекарственных препаратов объединены рядом общих принципов. В то же время существуют значительные различия в методических подходах к оценке ряда показателей качества, некоторая часть из которых нуждается в улучшении и оптимизации.

ЦЕЛЬ. Анализ современных регуляторных требований к качеству живых бактериальных вакцин разного состава и назначения, выявление показателей качества и методов их оценки, нуждающихся в усовершенствовании, и определение перспектив разработок в данном направлении.

ОБСУЖДЕНИЕ. Нормативная документация на все ЖБВ включает общие показатели качества. Одним из основных показателей качества вакцинного препарата является его подлинность. В связи с разработкой новых отечественных диагностических тест-систем апробированы возможности их использования для подтверждения подлинности бактериальных вакцин. Для контроля качества вакцины туляреминой успешно применили иммунохроматографический и серологический методы, для бруцеллезной – серологический, для чумной и сибиреязвенной рекомендован иммунохроматографический метод. Для вакцины БЦЖ был апробирован метод мультиплексной ПЦР с использованием реактивов от отечественных производителей. Перспективным методом совершенствования экспертизы качества вакцин туберкулезной и чумной по показателю «Определение количества живых микробных клеток» и вакцины чумной по показателю «Иммуногенность» является метод проточной цитометрии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Представленный анализ регуляторных требований свидетельствует о существовании проблемных вопросов, связанных с нормируемыми показателями качества ЖБВ и методами их оценки. Результаты анализа литературы и собственных исследований позволяют определить перспективные направления в методологии экспертизы качества ЖБВ, в частности использование для оценки показателя «Подлинность» коммерческих тест-систем отечественного производства.

Ключевые слова: живые бактериальные вакцины; туберкулез; чума; туляремия; сибирская язва; бруцеллез; Государственная фармакопея Российской Федерации; общая фармакопейная статья; экспертиза качества вакцины; контроль качества; оценка показателей качества

Для цитирования: Немировская Т.И., Касина И.В., Александрова Н.В., Алексеева С.А. Анализ современных регуляторных требований к качеству живых бактериальных вакцин и перспективы их усовершенствования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(4):456–466. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).
Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Analysis of current regulatory requirements for the quality of live bacterial vaccines and prospects for the improvement of vaccine quality control methods

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

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

 Tatiana I. Nemirovskaya; nemirovskaya@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Currently, there are live bacterial vaccines (LBVs) for the prevention of tuberculosis and particularly dangerous infections, such as plague, tularaemia, anthrax, and brucellosis. LBVs provide reliable and long-lasting protection. The high effectiveness of LBVs is due to their ability to mimic natural infections. Despite significant differences in LBV compositions, indications, and production species, the applicable quality control approaches share some common principles. At the same time, there are significant differences in methodological approaches to the assessment of a number of quality attributes, and some of these approaches require improvement and/or optimisation.

AIM. This study aimed to analyse current regulatory requirements for the quality of LBVs having different compositions and indications, to identify the quality attributes of LBVs with the associated quality control methods in need of improvement, and to explore promising pathways for further development in this area.

DISCUSSION. The review of regulatory standards and manufacturer specifications identified several quality attributes common to all LBVs. Vaccine identity was considered a key quality attribute. Motivated by the development of novel national diagnostic test systems, the authors analysed the performance of these test systems in practice to determine their potential for the identification of bacterial vaccines. In particular, immunochromatographic and serological techniques were successfully applied to the quality control of the tularaemia vaccine, a serological method was deemed suitable for brucellosis vaccines, and immunochromatography was recommended for plague and anthrax vaccines. A multiplex PCR method passed practical testing to be used for the quality control of BCG vaccines with reagents from Russian manufacturers. Flow cytometry was considered a promising technique for improving the quality control of LBVs in terms of viable units (tuberculosis and plague vaccines) and immunogenicity (plague vaccines).

CONCLUSIONS. This analysis of regulatory requirements highlighted problematic issues related to the standardised quality attributes of LBVs and methods for their assessment. The literature review results and the authors' own data indicate promising directions for improving the methodology of LBV quality assessment. One of these promising directions is the use of Russian-made commercial test systems for LBV identification.

Keywords:

live bacterial vaccines; tuberculosis; plague; tularaemia; anthrax; brucellosis; State Pharmacopoeia of the Russian Federation; general pharmacopoeial chapter; vaccine quality assessment; quality control; assessment of quality attributes

For citation: Nemirovskaya T.I., Kasina I.V., Aleksandrova N.V., Alekseeva S.A. Analysis of current regulatory requirements for the quality of live bacterial vaccines and prospects for the improvement of vaccine quality control methods. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):456–466. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с состоянием специфического антигена бактериальные вакцины подразделяют на живые и инактивированные. Живые вакцины должны содержать штаммы со стойко сниженной вирулентностью, но сохранившими свои иммуногенные свойства. При производстве бактериальных вакцин используют штаммы, обладающие типичными для своего вида культурально-морфологическими, тинкториальными (способность вступать в реакцию с красителями), биохимическими, серологическими свойствами, чувствительностью к специфическому бактериофагу, а также штаммы, стабильно утратившие гены патогенности и не способные реверсировать в вирулентное состояние. Штаммы не должны вызывать заболевание у людей и лабораторных животных, то есть быть специфически безопасными, но при этом сохранять остаточную вирулентность для лабораторных животных. Штаммы должны обеспечивать способность адаптироваться в организме и вызывать иммунобиологическую перестройку (выработку антител). Основным свойством вакцинных штаммов является иммуногенность, определяемая в тесте активной защиты лабораторных животных против летального действия вирулентного штамма [1, 2].

Живые бактериальные вакцины (ЖБВ) разрабатывают для профилактики туберкулеза (вакцина

туберкулезная (БЦЖ) живая, вакцина туберкулезная для щадящей первичной иммунизации (БЦЖ-М)) и особо опасных инфекций (ООИ): чумы, туляремии, сибирской язвы и бруцеллеза¹. Эпидемиологическая обстановка по данным инфекциям в Российской Федерации остается напряженной. В отличие от большинства зарубежных стран, в Российской Федерации вакцинация против туберкулеза включена в Национальный календарь профилактических прививок в качестве обязательной. Вакцинация против ООИ осуществляется исключительно по эпидемическим показаниям. Качество отечественных туберкулезных вакцин соответствует рекомендациям ВОЗ и требованиям Европейской фармакопеи (ЕФ). К качеству вакцин против ООИ такие требования отсутствуют [3–5]. Аналогов живых вакцин против ООИ в США и европейских странах не существует. Выпуск в гражданский оборот ЖБВ осуществляется в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации² (ГФ РФ) и нормативной документации (НД)³.

Работа по усовершенствованию экспертизы качества ЖБВ и внедрению современных и точных методов на различных уровнях постоянно ведется разными исследователями. В настоящей работе представлен обзорный материал по результатам многолетнего опыта (2016–2024 гг.)

¹ ФС.3.3.1.0011.15 Вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.
ФС.3.3.1.0016.15 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.
ФС.3.3.1.0018.15 Вакцина туберкулезная БЦЖ живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд.; 2016.
ФС.3.3.1.0019.15 Вакцина туляремиальная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.
ФС.3.3.1.0022.15 Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.
СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней.

² ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

³ НД Р N003612/01-120521 Вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения.
НД ЛСР-005759/08-231120 Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций.
НД Р N002348/01-111021 Вакцина туляремиальная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения.
НД Р N001273/01-161019 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения.
НД Р N001969/01-040418 Вакцина туберкулезная (БЦЖ), лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения.

исследований в этом направлении, включая работы, проведенные в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Цель работы – анализ современных регуляторных требований к качеству живых бактериальных вакцин разного состава и назначения, выявление показателей качества и методов их оценки, нуждающихся в усовершенствовании, и определение перспектив разработок в данном направлении.

Анализ регуляторных требований к качеству ЖБВ свидетельствует о существовании проблемных вопросов, связанных с показателями качества и методами их оценки, регламентированными нормативной документацией, а также определяет перспективы разработок в данном направлении, в том числе с использованием коммерческих тест-систем отечественного производства. Это будет способствовать расширению спектра методов контроля вакцинных препаратов в условиях отсутствия необходимых реагентов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В соответствии с ОФС «Вакцины и анатоксины» ГФ РФ⁴ на все ЖБВ имеются общие показатели качества: «Описание», «Время растворения или восстановления препарата», «Потеря в массе при высушивании», «Отсутствие посторонних бактерий и грибов», «Термостабильность» и др. (табл. 1) (опубликована на сайте журнала⁵). Основными показателями качества являются «Подлинность», «Специфическая активность. Общая концентрация микробных клеток», «Специфическая активность. Количество живых микробных клеток», «Специфическая активность. Количество прививочных доз», «Специфическая активность. Иммуногенность», «Специфическая безопасность». Ввиду особенностей производства ЖБВ имеют место определенные различия в составе спецификаций (табл. 2) (опубликована на сайте журнала⁶).

Так, качество препаратов по показателю «Средняя масса и однородность по массе» оценивают только для живых вакцин против ООИ. Для вакцины БЦЖ данный показатель отсутствует, так как масса препарата в ампуле недостаточна для проведения данного испытания. Туберкулезная вакцина имеет относительно небольшую общую концентрацию бактерий

(10–20 млн микробных клеток в 1 мг лиофилизата вакцины). Общее содержание микробных клеток определяют спектрофотометрическим методом по показателю оптической плотности. Данный показатель в вакцине отражает массу и однородность бактериальной суспензии.

Для оценки бактериальных суспензий живых вакцин против ООИ дополнительно применяют показатели «Седиментационная устойчивость», «Проходимость через иглу» и «рН».

В отличие от других бактериальных вакцин, вакцина туляремийная имеет дополнительные показатели качества, такие как «Степень диссоциации» и «Прививаемость». Выросшие колонии вакцинного штамма туляремийного микроба оценивают по степени диссоциации. Число иммуногенных колоний SR-типа белого цвета (круглые, гладкие, выпуклые колонии с ровными краями и блестящей поверхностью) должно быть не менее 80% от общего числа выросших колоний. Прививаемость оценивают по выраженности гиперемии и инфильтрата на кожном покрове в месте нанесения вакцины.

Оценка показателей качества вакцинных препаратов

Показатель качества «Подлинность»

В соответствии с ОФС.1.7.1.0018.18 «Иммунобиологические лекарственные препараты» ГФ РФ⁷ подлинность может подтверждаться различными лабораторными методами (биологическими, иммунобиологическими, молекулярными, химическими и физико-химическими), позволяющими специфически идентифицировать лекарственный препарат. В соответствии с требованиями НД подлинность вакцин туляремийной, бруцеллезной и чумной определяется иммунофлуоресцентным методом с помощью диагностических коммерческих препаратов – специфических флуоресцирующих иммуноглобулинов. Из-за временного отсутствия на отечественном рынке диагностических иммуноглобулинов может возникнуть дефектура вышеуказанных лекарственных препаратов. Поэтому необходимо внесение в НД альтернативных и/или дополнительных методов испытаний вакцин по показателю «Подлинность».

В вакцинах сибиреязвенной и туберкулезной подлинность подтверждается посредством микроскопии мазков из препарата, окрашенных

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

⁵ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466-table1>

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466-table2>

⁷ ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

по методу Циля – Нильсена для выявления кислотоустойчивых бактерий. В вакцине сибиреязвенной живой подлинность подтверждается методом, основанным на различиях в устойчивости к красителям структурно-функционально полноценных (потенциально живых) и дефектных спор. Данный метод объективно не подтверждает подлинность сибиреязвенной вакцины, так как не позволяет специфически идентифицировать споры сибиреязвенного антигена. Контроль качества вакцины БЦЖ по показателю «Подлинность» заключается в исследовании мазков, окрашенных на кислотоустойчивость по методу Циля – Нильсена, и по визуальному анализу характера колоний микроорганизма на среде Левенштейна – Йенсена. Согласно рекомендациям ВОЗ⁸ каждая посевная и коммерческая серия вакцины БЦЖ должна быть испытана молекулярно-биологическим методом на подлинность, то есть на соответствие именно тому штамму, который указан в НД на препарат.

В ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России с целью поиска альтернативных методов испытания вакцин против ООИ по показателю «Подлинность» был предложен и апробирован ряд возможных методов для подтверждения подлинности вакцин с помощью соответствующих диагностических препаратов от отечественных производителей. Предложенные коммерческие диагностические наборы и тест-системы подтверждают видовую принадлежность производственного вакцинного штамма в вакцине. В предыдущих работах авторов проведены исследования, показавшие успешное применение методов при контроле качества вакцины туляремийной иммунохроматографического и серологического метода, для бруцеллезной вакцины – серологического метода, для чумной вакцины – иммунохроматографического метода. При выявлении специфического антигена (липополисахарид *Francisella tularensis* и капсульный антиген F1 *Yersinia pestis*) вакцин туляремийной и чумной иммунохроматографическим методом были зафиксированы положительные результаты в концентрации вакцин 1×10^8 – 1×10^9 м.к./мл. В развернутой реакции агглютинации в рабочих разведениях 1:3200 или 1:800 сыворотки диагностической туляремийной или бруцеллезной соответственно наблюдалась агглютинация вакцин при легкой опалесценции надосадочной жидкости на +++ (по 4-крестовой системе оценки) [6–8].

Для контроля качества вакцины сибиреязвенной по показателю «Подлинность» успешно

апробированы иммунохроматографический и иммунофлуоресцентный методы с помощью отечественных коммерческих диагностических препаратов, выявляющие споры *Bacillus anthracis*. При выявлении специфического спорового антигена *B. anthracis* иммунохроматографическим методом были зафиксированы положительные результаты в концентрации вакцины 1×10^7 – 1×10^9 м.к./мл. При выявлении иммунофлуоресцентным методом в мазках вакцины, окрашенных иммуноглобулинами флуоресцирующими сибиреязвенными споры в рабочем разведении не менее 1:16, наблюдалась очень яркая, сверкающая флуоресценция оболочки зеленовато-желтого цвета, четко контрастирующая с темным телом споры на +++/++++ (система оценки по интенсивности свечения и количеству специфически светящихся клеток) [9].

Вышеуказанные методы могут быть рекомендованы для внесения их в НД для испытания вакцин против ООИ по показателю «Подлинность» в качестве дополнительных или альтернативных.

Для оценки показателя «Подлинность» вакцины БЦЖ апробировали метод мультиплексной ПЦР (мПЦР) с помощью реактивов от отечественных производителей. Метод мПЦР был использован авторами в международных коллаборативных испытаниях при оценке референс-субштаммов БЦЖ. В дальнейшем образцы отечественных серий посевного материала оценили при помощи мПЦР с такими же специфическими праймерами, которые указаны в руководствах ВОЗ. Показано, что метод мПЦР был адекватен и воспроизводим, при этом анализ полученных данных подтвердил стабильность посевных серий в процессе производства вакцины БЦЖ, а также коммерческих серий при их выпуске [10].

Исследования в данном направлении, в том числе и по применению других наборов для ПЦР, могут быть продолжены.

Показатель качества «Отсутствие посторонних бактерий и грибов» является одним из основных и общих показателей качества ЖБВ. Живые вакцины должны содержать только чистую культуру производственного вакцинного штамма, лиофилизированную в стабилизирующей среде. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность» ГФ РФ⁹ методом прямого посева с использованием только тиогликолевой среды [3]. Пересев осуществляют на 5–7 сут. При посеве вакцины туляремийной размножение туляремийного микроба

⁸ WHO Technical Report Series № 977, 60 report, 16–18. WHO; 2013.

⁹ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

в тиогликолевой среде происходит медленно; по поверхности среды образуется зона облако-видных образований и слабой опалесценции, что связано с аэрофильностью бактерий, поэтому специфические признаки роста микробных клеток в первичном посеве и пересеве сохраняются. Многочисленные испытания туляремийной вакцины, проведенные в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, показали, что, учитывая характер роста туляремийного микроба, возможно внесение изменений в методику проведения испытания путем исключения стадии пересева. Однако данное усовершенствование неприемлемо для испытания других вакцин против ООИ и туберкулезной вакцины [11].

Показатель качества

«Специфическая активность»

Общая концентрация микробных клеток»

Показатель «Специфическая активность» в ЖБВ против ООИ обусловлен общей концентрацией микробных клеток и количеством живых микробных клеток. Все методики подсчета общей концентрации бактерий изложены в ОФС.1.7.2.0008.15 «Определение концентрации микробных клеток» ГФ РФ¹⁰. Живые вакцины против ООИ содержат значительную концентрацию бактерий (1×10^{10} – 10×10^{10} м.к./мл). В вакцинах туляремийной, чумной и бруцеллезной общая концентрация микробных клеток (живые и неживые клетки) определяется визуально по ФСО 42-28-85П (ФСО – фармакопейный стандартный образец) мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (ФСО мутности 10 МЕ) и затем рассчитывается по формуле с использованием коэффициента концентрации для соответствующего микроба, указанного в инструкции по применению¹¹. В вакцине сибиреязвенной количество прививочных доз рассчитывается по формуле¹² исходя из общей концентрации спор, которую определяют в камере Горяева.

Проведенные в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России исследовательские работы указали на возможность подсчета общей концентрации спор в вакцине сибиреязвенной живой по ФСО мутности 10 МЕ, так как соответствующий эквивалент концентрации спор с недавнего времени указан в инструкции по применению. Установлено, что определение общей концентра-

ции спор по ФСО мутности 10 МЕ более объективно и информативно, так как споры могут слипаться и их подсчет в камере Горяева затруднен. Данный способ подсчета общей концентрации спор в вакцине сибиреязвенной живой может быть рекомендован для внесения в НД.

В процессе проведения испытания вакцины бруцеллезной живой в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России выявлено несоответствие коэффициента концентрации бруцелл по ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ фактическим данным $1,7 \times 10^9$ м.к./мл. Анализ результатов испытаний вакцины на производстве и в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России показал, что полученное при посеве количество живых микробных клеток в образцах вакцины достигало 100% или значительно превышало общую концентрацию, определенную по ФСО мутности 10 МЕ. Такие результаты противоречат как математическим, так и биологическим принципам. Экспериментально установлено, что концентрация бруцеллезного микроба по ФСО мутности 10 МЕ соответствует $3,0 \times 10^9$ м.к./мл [12].

Возможно, оптимальным решением при испытании готовых вакцин бруцеллезной, чумной и туляремийной был бы отказ от определения общей концентрации микробных клеток по ФСО мутности и только определение жизнеспособных микробных клеток методом прямого посева на питательные среды. Исходя из фактического количества живых микробных клеток в вакцинах чумной, бруцеллезной и туляремийной, определяют количество прививочных доз в ампуле и с учетом этих данных иммунизируют лабораторных животных при испытании по показателю «Иммуногенность».

Показатель качества

«Специфическая активность»

Количество живых микробных клеток»

«Золотым стандартом» для оценки специфической активности ЖБВ является микробиологический метод посева на специальные плотные питательные среды. По количеству выросших колоний (число колониеобразующих единиц, КОЕ) рассчитывают показатель жизнеспособных микробных клеток в вакцине и число прививочных доз в ампуле. Количество жизнеспособных клеток в живых вакцинах против ООИ должно составлять

¹⁰ ОФС.1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

¹¹ Инструкция по применению ФСО Государственной фармакопеи Российской Федерации. Стандартный образец мутности бактериальных взвесей ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) (10 МЕ), ФСО 3.1.00086 (ОСО 42-28-86) (5 МЕ).

¹² ОФС.1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

ФС.3.3.1.0016.15 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

от 25 до 60% от общей концентрации клеток. Методика проведения испытания жизнеспособности клеток в вакцинах против ООИ подразумевает использование больших объемов аналитических проб (десятикратные разведения 0,5 мл вакцины в 4,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида). В дальнейшем планируется усовершенствование методики определения количества живых микробных клеток в бруцеллезной, чумной и туляремийной вакцинах с использованием малых объемов аналитических проб. Предлагаемые изменения методики обеспечат экономичность расхода реагентов, а точные разведения вакцины можно достигнуть с помощью поверенных дозаторов.

В туберкулезных вакцинах количество живых микробных клеток оценивается ≈ 1 млн на 1 мг лифилизата вакцины. Метод прямого посева трудоемкий и времязатратный – учет результатов посева возможен не раньше, чем через 26–30 сут после начала испытания. Особенности морфологических характеристик микобактерий, в частности строение клеточной стенки и ее липидный состав [13, 14], обуславливают образование агрегатов из 5 до 20 и более клеток в восстановленной (после добавления растворителя) вакцине, что может затруднить учет результатов испытания. На смену методу прямого посева может прийти метод проточной цитометрии, который позволит получать информацию о метаболическом статусе популяции бактерий в процессе роста и на отдельных стадиях всей технологической цепочки [15–17]. Использование метода проточной цитометрии может быть перспективным направлением для стандартизации производства и контроля качества туберкулезных вакцин БЦЖ.

В литературе также представлены данные об успешном применении метода проточной цитометрии для определения количества живых микробных клеток в оценке качества вакцины чумной живой. Так, Н.В. Абзаева и соавт. показали, что результаты контроля качества данного препарата, полученные бактериологическим методом и методом проточной цитометрии, не имели достоверных различий и характеризовались высоким коэффициентом детерминации ($R^2=0,99$) [18]. Благодаря высокой информативности, скорости и простоте выполнения анализа метод проточной цитометрии является более предпочтительным и перспективным для других живых бактериальных вакцин в сравнении с традиционными методами анализа.

Показатель качества «Термостабильность»

ЖБВ дополнительно оценивают по показателю «Термостабильность». В вакцинах бруцеллезной,

чумной и туляремийной этот показатель определяется сроком, в течение которого в препарате сохраняется 50% живых микробных клеток по отношению к первоначальному количеству после хранения вакцин при температуре 37 ± 1 °С в течение регламентированного НД отрезка времени. Вакцину сибиреязвенную по данному показателю качества не оценивают, так как споры более устойчивы к неблагоприятным условиям окружающей среды. В соответствии с НД в определенном отрезке времени допускается транспортировка вакцины сибиреязвенной без соблюдения «холодовой цепи». Вакцину для профилактики туберкулеза считают прошедшей испытание, если при хранении в течение 28 сут при температуре 37 ± 1 °С число жизнеспособных микробных клеток составляет не менее 20% от их исходного числа. Вакцины против ООИ соответствуют требованиям НД, если значение показателя «Термостабильность», рассчитанное в сутках, составляет ≥ 4 сут (вакцина чумная) и ≥ 7 сут (вакцины туляремийная и бруцеллезная). Данный показатель в вакцинах туберкулезных оценивают в каждой пятой выпущенной серии; в вакцинах чумной, туляремийной и бруцеллезной – в каждой серии. В настоящее время при хранении и транспортировке лекарственных препаратов четко соблюдается «холодовая цепь». Поэтому считаем, что по показателю «Термостабильность» может быть испытана не каждая серия вакцины чумной, туляремийной и бруцеллезной.

Показатели качества живых бактериальных вакцин, определяемые биологическими методами

Показатель качества

«Специфическая безопасность»

Специфическую безопасность ЖБВ подтверждают на моделях разных видов лабораторных животных, адекватно отвечающих на соответствующие инфекции: бруцеллезную вакцину исследуют на белых мышах; сибиреязвенную – на кроликах; чумную, туляремийную и туберкулезную вакцины – на морских свинках. Животным вводят несколько прививочных доз, исходя из рекомендованных для человека, и оценивают их выживаемость, токсическое действие на организм, возникновение местных и общих реакций организма в течение срока наблюдения, отсутствие специфических признаков соответствующих инфекций. Например, при оценке качества вакцин туберкулезной и туляремийной допускается гибель одной опытной морской свинки из трех (вакцина туляремийная) и одной из шести (вакцина туберкулезная).

При контроле других вакцин гибель животных исключена, но возможны проявления некоторых нежелательных общих и местных реакций, таких как снижение массы тела и некроз в месте введения. При контроле вакцины чумной после вскрытия морской свинки недопустимо выделение вакцинного штамма из легкого и крови, но допустимо его обнаружение в биоматериале из места введения и регионарного лимфоузла. При оценке специфической безвредности туберкулезной вакцины при вскрытии животных через 6 нед. после введения вакцинного препарата не допускается наличие признаков туберкулезной инфекции, что должно свидетельствовать об отсутствии вирулентных микробактерий. Испытания вакцин сибиреязвенной и туберкулезной по этому показателю являются приемлемыми и не требуют никаких изменений. В дальнейшем для вакцин туляремийной, бруцеллезной и чумной предполагается проведение исследований по изменению дозы для введения животным, рассчитанной не из величины общей концентрации, а исходя из количества живых микробных клеток и количества прививочных доз для человека.

В НД на вакцину туберкулезную указан дополнительный показатель качества «Аномальная токсичность», который оценивают в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность» Государственной фармакопеи Российской Федерации¹³ по стандартной методике. Данный показатель отсутствует в НД на живые вакцины против ООИ, так как вакцинные штаммы обладают остаточной вирулентностью для лабораторных животных, соответственно допускается определенный процент их гибели.

Показатель качества «Иммуногенность»

Основным показателем качества профилактических вакцин является их иммуногенная активность, определяемая в тесте активной защиты лабораторных животных против летального воздействия вирулентного штамма. При испытании вакцин чумной, туляремийной и бруцеллезной лабораторных животных иммунизируют определенными дозами живых микробных клеток, содержащихся в препарате. В сибиреязвенной вакцине животных иммунизируют одной подкожной прививочной дозой исходя из общей концентрации спор.

Иммуногенность живых вакцин против ООИ определяют несколькими способами:

- в чумной вакцине – по расчету эффективной дозы ED_{50} (50% effective dose) живых микробных клеток вакцинного штамма, которая обеспечивает 50% выживаемость лабораторных животных после заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 в дозе 200 Dcl (dosis certa letalis – заведомо смертельная доза);
- в сибиреязвенной вакцине – по индексу иммунитета (значение индекса должно быть не менее 10000^{14});
- в туляремийной вакцине – в тесте активной защиты; не менее 8 из 10 морских свинок, привитых накожно, должны быть защищены от гибели после заражения 1000 Dcl вирулентным штаммом туляремийного микроба голарктической расы, 1 Dcl которого не должно превышать 5 м.к.

При контроле иммуногенности бруцеллезной вакцины среди иммунизированных морских свинок определяют процент инфицирования вирулентным штаммом, так как данная инфекция для них не является летальной. Животных после регламентированных сроков наблюдения подвергают эвтаназии и далее выполняют соответствующие патоморфологические исследования. В опыте с бруцеллезной вакциной делают бактериологические посеvy биоматериала лимфатических узлов, печени и селезенки на предмет отсутствия роста вирулентного штамма *B. melitensis*.

Показатель качества «Иммуногенность» в НД на туберкулезную вакцину отсутствует. В ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по этому показателю исследуется только туберкулезный производственный вакцинный штамм.

Испытание вакцин против ООИ по показателю «Иммуногенность» каждой выпущенной серии не проводится. При производстве вакцин чумной и сибиреязвенной предусмотрен контроль каждой пятой серии по этому показателю; вакцин туляремийной и бруцеллезной – одной серии, из числа выпущенных в первом и втором полугодии.

В настоящее время разрабатывают перспективные подходы к оценке качества вакцины чумной по показателю «Иммуногенность». Показана возможность применения антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* и технологии цитометрического анализа [8]. В результате исследования обнаружено, что у экспериментальных животных (белые мыши), вакцинированных живыми микробными клетками в дозах 4×10^3 – 1×10^6 , наивысший уровень экспрессии

¹³ ОФС.1.2.4.0004.15 Аномальная токсичность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

¹⁴ Индекс иммунитета – отношение величины LD_{50} заражающего тест-штамма *B. anthracis* 71/12 для иммунизированных животных к величине LD_{50} для неиммунизированных (контрольных) животных (морских свинок).

ФС.3.3.1.0016.15 Вакцина сибиреязвенная живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд.; 2016.

лимфоцитами маркера ранней активации (CD25) при антигенной стимуляции *in vitro* регистрируется на 14 сут после иммунизации; при этом количество CD25⁺ лимфоцитов в среднем в 6,8 раза выше, чем в контрольной группе животных. Установлена высокая корреляция между количеством выживших животных и увеличением количества CD25⁺ лимфоцитов. Исследования в этом направлении могут быть перспективными и для других вакцин. В данных испытаниях не проводится заражение лабораторных животных вирулентными штаммами микроорганизмов I–II групп патогенности, что свидетельствует о гуманном отношении к животным, сокращении сроков проведения испытания и исключения биологической опасности.

Впервые проведенный сравнительный анализ регуляторных требований к качеству ЖБВ разного состава и назначения свидетельствует о наличии как ряда общих принципов оценки

качества вакцинных препаратов, так и о существовании проблемных вопросов, связанных с необходимостью усовершенствования показателей качества и методов их контроля. Результаты анализа литературы и собственных исследований позволяют определить перспективные направления в методологии экспертизы качества ЖБВ (табл. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что живые бактериальные вакцины (ЖБВ) существуют давно и относятся к вакцинам первого поколения, они обладают рядом несомненных преимуществ. В первую очередь это высокая эффективность, обусловленная имитацией естественной инфекции, что важно для создания надежной и длительной защиты организма. Для формирования надежного иммунитета часто достаточно однократного введения вакцины. Пути введения ЖБВ

Таблица 3. Перспективные или альтернативные методы испытания живых бактериальных вакцин

Table 3. Promising and/or orthogonal methods for testing live bacterial vaccines

Наименование вакцины <i>Vaccine name</i>	Показатель качества <i>Quality attribute</i>	Метод испытания <i>Test method</i>
Вакцина чумная живая <i>Live plague vaccine</i>	Подлинность <i>Identification</i>	Иммунохроматографический метод [7] <i>Immunochromatography [7]</i>
	Специфическая активность. Количество живых микробных клеток <i>Potency: count of viable units</i>	Проточная цитометрия [18] <i>Flow cytometry [18]</i>
	Специфическая активность. Иммуногенность <i>Potency: immunogenicity</i>	Проточная цитометрия [8] <i>Flow cytometry [8]</i>
Вакцина туляремия живая <i>Live tularaemia vaccine</i>	Подлинность <i>Identification</i>	Иммунохроматографический <i>Immunochromatography</i> Серологический метод (реакция агглютинации) [6] <i>Serological assay (agglutination reaction) [6]</i>
Вакцина сибиреязвенная живая <i>Live anthrax vaccine</i>	Подлинность <i>Identification</i>	Иммунохроматографический метод Иммунофлуоресцентный метод [9] <i>Immunochromatography</i> <i>Immunofluorescence test [9]</i>
	Специфическая активность. Концентрация микробных клеток <i>Potency: microbial cell concentration</i>	Визуальный по ФСО мутности 10 МЕ и расчету по формуле <i>Visual inspection using 10 IU pharmacopoeia standard for bacterial suspension turbidity and formula-based calculation</i>
Вакцина бруцеллезная живая <i>Live brucellosis vaccine</i>	Подлинность <i>Identification</i>	Серологический метод (реакция агглютинации) [6] <i>Serological assay (agglutination reaction) [6]</i>
Вакцина туберкулезная БЦЖ <i>Tuberculosis vaccine (BCG)</i>	Подлинность <i>Identification</i>	Мультиплексная ПЦР [10] <i>Multiplex PCR [10]</i>
	Специфическая активность. Количество живых микробных клеток <i>Potency: count of viable units</i>	Проточная цитометрия [15–17] <i>Flow cytometry [15–17]</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание: ФСО – фармакопейный стандартный образец; ПЦР – полимеразно-цепная реакция; МЕ – международные единицы.

Note: PCR, polymerase chain reaction; IU, international units.

могут быть достаточно простыми, например скарификационный, ингаляционный или под-кожный путь.

На основании проведенного анализа можно сделать заключение о целесообразности и необходимости внесения в регуляторные тре-

бования современных методов экспертизы ЖБВ в качестве альтернативных и/или дополнительных, что позволит избежать дефектуры из-за отсутствия необходимых реагентов и расширить возможности выбора метода контроля на производстве и в экспертной организации.

Литература/References

1. Медуницын НВ, Катлинский АВ, Ворслов ЛО. *Вакцинология: монография*. М.: Практическая медицина; 2022. Medunitsyn NV, Katlinsky AV, Vorslov LO. *Vaccinology: monograph*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2022 (In Russ.). EDN: [FOLWPT](#)
2. Дятлов ИА. Современные технологические платформы для разработки вакцин против опасных бактериальных инфекций (часть II). *Бактериология*. 2022;7(4):5–9. Dyatlov IA. Modern technological platforms for the development of vaccines against dangerous bacterial infections (part II). *Bacteriology*. 2022;7(4):5–9 (In Russ.). EDN: [DNAHCO](#)
3. Саяпина ЛВ, Бондарев ВП, Олефир ЮВ. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(2):107–10. Sayapina LV, Bondarev VP, Olefir YuV. Current state of vaccine prophylaxis of particularly dangerous infections. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(2):107–10 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-107-110>
4. Щипелева ИА, Кретенчук ОФ, Коршенко ВА, Марковская ЕИ. Современное состояние и перспективы специфической профилактики чумы. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2022;12(1):101–9. Shchipeleva IA, Kretenchuk OF, Korshenko VA, Markovskaya EI. Current status and prospects for specific plague prevention. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2022;12(1):101–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.18565/epidem.2022.12.1.101-9>
5. Сычева АА, Алгазина ВВ, Полякова АС. Вакцина БЦЖ и новые противотуберкулезные вакцины. *Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза*. 2021;(S1):27–8. Sycheva AA, Algazina BB, Polyakova AS. BCG vaccine and new tuberculosis vaccines. *CTRI Bulletin*. 2021;(S1):27–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.7868/S2587667821050095>
6. Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Применение альтернативных методов оценки качества вакцины туляремийной живой и вакцины бруцеллезной живой по показателю «Подлинность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):61–75. Kasina IV, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI. Application of alternative identification methods for live tularemia and brucellosis vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):61–75 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-61-75>
7. Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Оценка возможности применения иммунохроматографического метода для экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена туляремийного (Тулярина) по показателю «Подлинность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):231–40. Kasina IV, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI. Evaluation of the applicability of immunochromatography to the identification of live plague vaccines and the tularemia allergen (Tularin). *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):231–40 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-231-240>
8. Гостищева СЕ, Абзаева НВ, Ракитина ЕЛ, Пономаренко ДГ, Костюченко МВ, Логвиненко ОВ, Куличенко АН. Перспективный подход к оценке качества вакцины чумной живой по показателю иммуногенности. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019;18(1):50–4. Gostischeva SE, Abzaeva NV, Rakitina EL, Ponomarenko DG, Kostuchenko MV, Logvinenko OV, Kulichenko AN. Perspectives approach to the assessment of the quality of the vaccine plague live in terms of immunogenicity. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2019;18(1):50–4 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-1-50-54>
9. Алексеева СА, Касина ИВ, Немировская ТИ. Сравнительный анализ результатов испытаний вакцины сибирезанной живой по показателю «Подлинность» иммунофлуоресцентным и иммунохроматографическим методами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):348–56. Alekseeva SA, Kasina IV, Nemirovskaya TI. Comparative analysis of the results of live anthrax vaccine identification by immunofluorescence and immunochromatography. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):348–56 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-348-356>
10. Леви ДТ, Обухов ЮИ, Александрова НВ, Волкова РА, Эльберт ЕВ, Альварес Фигероа МВ и др. Оценка подлинности и стабильности вакцины БЦЖ методом мультиплекной ПЦР. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(1):49–54. Levi DT, Obukhov Yul, Aleksandrova NV, Volkova RA, Elbert EV, Alvarez Figeroa MV, et al. Identity and stability assessment of BCG vaccine by multiplex PCR. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(1):49–54 (In Russ.). EDN: [VSCURV](#)
11. Суханова СМ, Саяпина ЛВ, Бердникова ЗЕ, Тихонова АС, Климов ВИ. Проблемы оценки «стерильности» живых бактериальных вакцин. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(3):87–93. Sukhanova SM, Sayapina LV, Berdnikova ZE, Tikhonova AS, Klimov VI. Problems of assessment of live bacterial vaccine sterility. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(3):87–93 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-3-87-93>
12. Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины бруцеллезной живой по показателю «Специфическая активность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(2):126–35. Kasina IV, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI. Prospects for improving quality evaluation of the live brucellosis vaccine in terms of specific activity. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):126–35 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-126-135>
13. Guallar-Garrido S, Almiñana-Rapún F, Campo-Pérez V, Torrents E, Luquin M, Julián E. BCG substrains change their outermost surface as a function of growth media. *Vaccines (Basel)*. 2021;10(1):40. <https://doi.org/10.3390/vaccines10010040>
14. Prados-Rosales R, Carreño LJ, Weinrick B, Batista-Gonzalez A, Glatman-Freedman A, Xu J, et al. The type of growth medium affects the presence of a mycobacterium capsule and is associated with differences in protective efficacy of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 2016;214(3):426–37. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw153>

15. Pascoe J, Hendon-Dunn CL, Birch CPD, Williams GA, Chambers MA, Bacon J. Optimisation of *Mycobacterium bovis* BCG fermentation and storage survival. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):900. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090900>
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. Moghawry HM, Rashed ME, Goma 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>
18. Абзаева НВ, Кузнецова ИВ, Гостищева СЕ, Жиров АМ, Ковалев ДА, Костроминов АВ и др. Перспективы применения метода проточной цитометрии в оценке качества препарата вакцины чумной живой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):560–9. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-560-569>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Т.И. Немировская** – общее руководство, концепция, критический пересмотр текста рукописи и утверждение окончательной версии статьи для публикации; **И.В. Касина** – обобщение и анализ регуляторных требований к показателям качества бруцеллезной, туляремийной вакцин и перспектив усовершенствования методов их контроля качества, написание и обсуждение текста рукописи; **Н.В. Александрова** – обобщение и анализ регуляторных требований к показателям качества туберкулезной вакцины (БЦЖ) и перспектив усовершенствования методов контроля качества, обсуждение и написание текста рукописи; **С.А. Алексеева** – обобщение и анализ регуляторных требований к показателям качества сибиреязвенной, чумной вакцин и перспектив усовершенствования методов их контроля качества, обсуждение и редактирование текста рукописи.

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены *таблицы 1, 2*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466-table1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466-table2>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **T.I. Nemirovskaya** provided general guidance, conceptualised the study, critically revised the manuscript, and approved the final version for publication. **I.V. Kasina** collated and analysed regulatory requirements for quality attributes of brucellosis and tularemia vaccines, studied prospects for the improvement of quality control methods for these vaccines, drafted and discussed the manuscript. **N.V. Aleksandrova** collated and analysed regulatory requirements for quality attributes of tuberculosis vaccines (BCG), studied prospects for the improvement of quality control methods for these vaccines, drafted and discussed the manuscript. **S.A. Alekseeva** collated and analysed regulatory requirements for quality attributes of anthrax and plague vaccines, studied prospects for the improvement of quality control methods for these vaccines, discussed and edited the manuscript.

Additional information. *Tables 1, 2* are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466-table1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466-table2>

Об авторах / Authors

Немировская Татьяна Ивановна, канд. мед. наук / **Tatiana I. Nemirovskaya**, Cand. Sci. (Med.)

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

Касина Ирина Владимировна, канд. биол. наук / **Irina V. Kasina**, Cand. Sci. (Biol.)

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

Александрова Наталья Владимировна, канд. мед. наук / **Natalia V. Aleksandrova**, Cand. Sci. (Med.)

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

Алексеева Светлана Александровна, канд. биол. наук / **Svetlana A. Alekseeva**, Cand. Sci. (Biol.)

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

Поступила 21.08.2024

После доработки 21.10.2024

Принята к публикации 06.12.2024

Received 21 August 2024

Revised 21 October 2024

Accepted 6 December 2024



Оценка жизнеспособности тест-штамма *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 в ампулах и флаконах методом ускоренного хранения

А.А. Воропаев , О.Ц. Цыдыпова, О.В. Фадейкина, Д.С. Давыдов

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

 Воропаев Андрей Андреевич; voropaev@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Важными задачами ведения коллекций микроорганизмов являются обеспечение стабильности свойств и поддержание жизнеспособности микробиологических культур во время хранения и при транспортировке. При использовании коллекционных штаммов микроорганизмов в качестве контрольных образцов в ряде случаев необходимы точные данные о количестве живых микробных клеток в каждом образце, в связи с чем актуальна разработка и применение методики прогнозирования гарантийных сроков хранения тест-штаммов.

ЦЕЛЬ. Оценить изменение жизнеспособности тест-штаммов для прогнозирования гарантийных сроков их хранения в различной первичной упаковке на примере штамма *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 методом ускоренного хранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе использовали лиофилизированные образцы культуры штамма *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017, депонированного в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. В качестве первичной упаковки применены ампулы боросиликатные вакуумного наполнения и флаконы для лиофилизации стандарта 2R. Проведена оценка образцов по ряду показателей качества (потеря в массе при высушивании, количество жизнеспособных клеток, выживаемость клеток, морфология колоний, биохимическая идентификация) и смоделировано ускоренное хранение при повышенных температурах (35–65 °С).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Существенных различий качества лиофилизированных образцов в зависимости от типа первичной упаковки не выявлено. Экспериментально определены константы дезактивации жизнеспособности микробиологических культур при хранении образцов при повышенных температурах. Рассчитаны константы дезактивации для температур транспортировки и хранения в различной первичной упаковке. Прогнозируемое время снижения жизнеспособности клеток до 10% составляет 19 лет при хранении во флаконах и 25 лет – в ампулах. Прогнозируемое время снижения жизнеспособности клеток до 50% составляет 5,8 и 7,6 года – для флаконов и ампул соответственно.

ВЫВОДЫ. Анализ результатов исследования подтвердил возможность использования различных типов первичной упаковки (ампулы и флаконы) для лиофильного высушивания и хранения тест-штаммов микроорганизмов. Полученные данные могут быть использованы для дальнейших исследований и разработки рекомендаций по хранению лиофилизированных штаммов в различных типах упаковки.

Ключевые слова: лиофилизация; тест-штаммы; тест ускоренного хранения; коллекция микроорганизмов; биологические препараты; лекарственные средства; контроль качества

Для цитирования: Воропаев А.А., Цыдыпова О.Ц., Фадейкина О.В., Давыдов Д.С. Оценка жизнеспособности тест-штамма *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 в ампулах и флаконах методом ускоренного хранения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(4):467–475. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-467-475>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Viability assessment of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 in ampoules and vials by the accelerated shelf-life testing method

Andrey A. Voropaev✉, Olga T. Cidipova, Olga V. Fadeikina, Dmitry S. Davydov

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

✉ Andrey A. Voropaev; voropaev@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. A key priority in maintaining a collection of microorganisms is to ensure the stability of characteristics and the viability of microbial cultures during their storage and transport. In addition, some applications of collection strains as control samples require accurate data on the number of viable microbial cells in each sample. Therefore, it is necessary to develop and implement an analytical procedure for predicting the guaranteed shelf life of test strains.

AIM. This study aimed to predict the guaranteed shelf life for test strains in a variety of primary packaging by assessing changes in microbial viability under accelerated storage conditions, with the *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 strain as a model organism.

MATERIALS AND METHODS. The study used lyophilised samples of the *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 strain deposited in the National Collection of Pathogenic Microorganisms (NCPM) at the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation. The studied primary packaging types included vacuum-filled borosilicate glass ampoules and 2R lyophilisation vials. The samples were tested for a number of quality attributes (loss on drying, viable cell count, cell viability, colony morphology, and biochemical identification) and subjected to accelerated shelf-life testing at elevated temperatures (35–65 °C).

RESULTS. The study did not show any significant differences in the quality of lyophilised samples depending on the type of primary packaging. The authors experimentally determined rate constants for the loss of viability in microbial cultures during storage at elevated temperatures and calculated the rate constants for the storage and transport temperatures and for different types of primary packaging. The predicted time to viable cell count reduction to 10% of the initial level was 19 years for vials and 25 years for ampoules, and the predicted time to 50% viability was 5.8 years for vials and 7.6 years for ampoules.

CONCLUSIONS. The results of this study confirm the applicability of different primary packaging (ampoules and vials) for the lyophilisation and storage of microbial test strains. The data obtained can guide further research and contribute to the development of recommendations for the storage of lyophilised strains in various types of packaging.

Keywords: lyophilisation; test strains; accelerated shelf-life testing; collection of microorganisms; biologicals; medicines; quality control

For citation: Voropaev A.A., Cidipova O.T., Fadeikina O.V., Davydov D.S. Viability assessment of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 in ampoules and vials by the accelerated shelf-life testing method. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):467–475. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-467-475>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Задачами ведения коллекций микроорганизмов, особенно государственных коллекций, являются обеспечение сохранения свойств и жизнеспособности микроорганизмов, а также коллекционного фонда и обеспечение лабораторий образцами штаммов микроорганизмов (в том числе тест-штаммы) надлежащего качества для проведения научно-исследовательских и производственных работ, микробиологического контроля, оценки качества лекарственных средств и медицинских изделий [1].

Для решения данных задач применяют различные методы консервации микроорганизмов, среди которых лиофилизация является основным методом для высушивания из замороженного состояния в вакууме. Лиофилизированные образцы тест-штаммов возможно транспортировать в пределах Российской Федерации при температуре окружающей среды. Долгосрочное хранение штаммов осуществляют при температуре плюс 2–8 °С. В герметично запаянных под вакуумом ампулах коллекционные штаммы могут храниться практически неограниченное время, и это основное применение подобного типа емкости. Однако для конечного потребителя предпочтительнее использовать штаммы, расфасованные во флаконы, укупоренные резиновой пробкой и завальцованные. Такую упаковку легче вскрыть, нет опасности перегрева культуры во время вскрытия в пламени горелки или повреждения кожных покровов острыми осколками и, следовательно, отсутствует риск нарушения режима биологической безопасности в лабораторных условиях [2, 3].

Технология изготовления лиофилизатов в ампулах и флаконах также различается: при высушивании в ампулах используют ватные фильтры, создающие барьер для испарения удаляемой влаги; ампулы запаивают вне камеры лиофильного аппарата, что может сказаться на величине остаточной влажности (значение показателя «Потеря в массе при высушивании», важного для последующей сохранности качества лиофилизата и жизнеспособности культуры) [4, 5]. Недостатком использования ампул является трудоемкость процедуры запаивания ампул,

для выполнения которой требуются специальные навыки. Недостаток использования флаконов связан с возможной частичной усушкой пробки при длительном хранении, превышающем срок годности пробки, вследствие чего может быть нарушение герметичности упаковки. Запаянные ампулы являются лучшим выбором для долгосрочного хранения, а флаконы с резиновыми пробками – для снабжения тест-штаммами микробиологических лабораторий.

Поскольку требуется гарантировать сохранение жизнеспособности тест-штаммов независимо от цели их использования, то важно спрогнозировать гарантийное время их хранения как при долгосрочном хранении, так и при транспортировке к конечному потребителю, которая, как правило, осуществляется при температуре окружающей среды. Для такого прогнозирования можно использовать метод ASLT (Accelerated Shelf-Life Testing, метод ускоренного тестирования срока хранения или метод ускоренного хранения), который успешно используется для определения сроков годности биологических препаратов, образцов бактериофагов и микроорганизмов, а также лиофилизированных лекарственных средств [6–9].

Основой метода является выдерживание образцов при нескольких повышенных температурах с последующим расчетом констант дезактивации для различных температур [10]. Исходя из уравнения Аррениуса, логарифмы констант дезактивации линейно зависят от температуры (1):

$$\log k = \log k_0 - \frac{E_a}{2,303R} \times \frac{1}{T}, \quad (1)$$

где k_0 – экспериментально рассчитанная константа дезактивации, T – абсолютная температура в Кельвинах, R – газовая постоянная, E_a – энергия активации, \log – логарифм с основанием 10.

Таким образом, зная константы дезактивации при повышенных температурах, методом экстраполяции можно определить константу для целевой температуры хранения и прогнозировать гарантийное время хранения штаммов.

Цель работы – оценить изменение жизнеспособности тест-штаммов для прогнозирования гарантийных сроков их хранения в различной первичной упаковке на примере штамма *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 методом ускоренного хранения.

Для достижения указанной цели были сформулированы следующие задачи: приготовить лиофилизированные образцы тест-штамма в ампулах и флаконах; оценить образцы по показателям качества лиофилизатов; провести хранение образцов при различных повышенных температурах; экспериментально определить константы дезактивации при повышенных температурах и рассчитать константы дезактивации при температурах хранения и транспортировки; определить гарантированное время хранения лиофилизованного тест-штамма *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 в разной первичной упаковке при температурах хранения и транспортировки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе применяли следующие материалы: тест-штамм микроорганизмов, рекомендованный для проведения испытаний в ОФС.1.2.4.0002.15¹ *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017; питательная среда ГРМ-агар (серия О1-К-683, ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора); сахарозо-желатиновая среда (защитная среда), содержащая 20% сахарозы (кат. № 1.07653, серия К48546153, Merck, США) и 2% желатина (кат. № 1.04070, серия VM918570, Merck, США); фармакопейный стандартный образец (ФСО) ГФ РФ мутности бактериальных взвесей 20 МЕ ФСО 3.1.00084 (ОСО 42-28-84), серия S-2/8-010122, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); ампулы с внутренним диаметром 8 мм, изготовленные из боросиликатной стеклотрубки (Simax®, Чехия); флаконы для лиофилизации стандарта 2R (кат. № 1637441, серия 6106541118, Schott Pharma, Германия).

Оборудование

В работе использовали измерительное и испытательное оборудование, прошедшее поверку (квалификацию, аттестацию): сушка лиофильная Epsilon 2-4 LSCplus (Martin Christ, Германия); весы специальные класса 1 ML204T/A00 (Mettler Toledo, Швейцария); морозильник

MDF-193AT (Panasonic Healthcare, Япония); лиофильный аппарат Usifroid M.S.R. 18 (Usifroid, Франция); генератор плазмы PG 1200 (Fergutes, Нидерланды); вакуумно-сушильный шкаф VD 23 (Binder, Германия); термостат ТС-1/80 СПУ (АО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия); шкаф ламинарный БАВ п-01-1,2, класс защиты II (ЗАО «Ламинарные системы», Россия);

Методы

Подготовка тест-штаммов к высушиванию.

Культивирование тест-штаммов проводили при температуре 37 ± 2 °С на поверхности агаризованной среды в чашках Петри в течение 20–24 ч. Для лиофильного высушивания использовали 20-часовую культуру. Бактериологической петлей отбирали колонии и готовили суспензию, соответствующую 20 МЕ ФСО мутности бактериальных взвесей. Полученную суспензию объединяли в равном объеме с сахарозо-желатиновой защитной средой и вносили по 0,2 мл в ампулы и по 0,5 мл во флаконы. Для определения концентрации жизнеспособных клеток до высушивания суспензию десятикратно разводили и проводили посев на поверхности агаризованной среды в чашках Петри.

Лиофилизация. Замораживание и высушивание проводили в рамках одного цикла лиофилизации. Образцы замораживали до температуры минус 40 °С в течение 4 ч, первичное высушивание проводили под вакуумом 0,1 мбар в течение 12 ч, плавно повышая температуру полки от минус 20 до 0 °С. Досушивание проводили в течение 7 ч при температуре 30 °С. Флаконы укупоривали под вакуумом в камере лиофильной сушки, ампулы доставали из лиофильного аппарата и запаивали под вакуумом на специальном устройстве для запаивания ампул.

Определение вакуума/герметизации проводили согласно ОФС.1.8.1.0002.15².

Определение времени растворения проводили согласно ОФС.1.4.1.0031.18³.

Определение потери в массе при высушивании в испытании по способу 1 из ОФС.1.2.1.0010.15⁴ использовали 10 ампул и 4 флакона.

Определение количества жизнеспособных микробных клеток проводили по методике, описанной в работе А.А. Воропаева с соавт. [5]. Лيوфилизат ресуспендировали стерильной водой, внося 0,2 мл в ампулы и 0,5 мл во флаконы. При определении количества жизнеспособных

¹ ОФС 1.2.4.0001.15 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

² ОФС 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV изд.; 2018.

³ ОФС 1.4.1.0031.18 Лيوфилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

⁴ ОФС 1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

микробных клеток для оценки каждого исследуемого параметра (температура и время хранения) использовали по три образца (ампулы или флаконы). Содержимое каждого образца разводили десятикратно, после чего из разведений высевали по 0,1 мл в три чашки с питательной средой и инкубировали в течение 24 ч при температуре 37 ± 2 °С. Для каждой температуры и времени хранения получали результаты ($n=9$) по определению количества жизнеспособных микробных клеток [5].

Тест ускоренного хранения. Флаконы и ампулы помещали в вакуумный сушильный шкаф, нагретый до необходимой температуры (35, 45, 55 или 65 °С). Через определенные промежутки времени образцы вынимали и определяли концентрацию жизнеспособных микроорганизмов. Константу дезактивации k рассчитывали по формуле (2):

$$k = \frac{1}{t} (\log N_0 - \log N), \quad (2)$$

где N_0 – начальная концентрация микроорганизма, N – концентрация микроорганизма после хранения при повышенной температуре, \log – логарифм с основанием 10, t – время хранения при повышенной температуре (ч) [11].

Статистическая обработка результатов. Среднее значение, стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение и коэффициент корреляции Пирсона рассчитывали с помощью программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подготовка лиофилизированных образцов

Подготовленные образцы штамма *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 после лиофильного высушивания оценивали по параметрам качества, представленным в *таблице 1*: описание (внешний вид); потеря в массе при высушивании; вакуум/герметизация; время растворения лиофилизата. Восстановленную из лиофильного состояния культуру оценивали по количеству жизнеспособных клеток, выживаемости, морфологии колоний и биохимической активности. Концентрация микробных клеток в исходной суспензии до высушивания составила $(4,16 \pm 0,40) \times 10^8$ КОЕ/мл. После высушивания результаты оценки качества лиофилизированных образцов во флаконах и ампулах оказались сопоставимы. Единственное различие наблюдали для показателя «Потеря в массе при высушивании»: 2,0% – для ампул, 1,3% – для флаконов (*табл. 1*). Вероятно, это связано с наличием ватного фильтра и особенностями процедуры запаивания ампул.

Проведение теста ускоренного хранения

Испытания проводили при четырех разных повышенных температурах с шагом в 10 °С (35, 45, 55 и 65 °С). Время отбора проб подбирали экспериментально для каждой температуры таким образом, чтобы снижение количества жизнеспособных клеток было статистически значимым. Результаты проведения теста представлены в *таблице 2*.

Таблица 1. Влияние первичной упаковки (флаконы/ампулы) на качество лиофилизированных образцов

Table 1. Influence of primary packaging (vials/ampoules) on the quality of lyophilised samples

Показатели качества лиофилизированных образцов <i>Quality attributes of lyophilised samples</i>	Ампулы <i>Ampoules</i>	Флаконы для лиофилизации <i>Lyophilisation vials</i>
Описание <i>Appearance</i>	Сухая пористая масса в виде таблетки, цельная <i>Dry, porous, and uniform cake</i>	Сухая пористая масса в виде таблетки, цельная <i>Dry, porous, and uniform cake</i>
Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	2,0±0,2	1,3±0,1
Вакуум/герметизация <i>Vacuum/sealing</i>	Вакуум не более 10 гПа <i>Vacuum of ≤10 hPa</i>	Вакуум не более 10 гПа <i>Vacuum of ≤10 hPa</i>
Время растворения лиофилизата, с <i>Reconstitution time, s</i>	<10	<10
Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл <i>Viable cell count, CFU/mL</i>	$(3,06 \pm 0,02) \times 10^8$	$(3,06 \pm 0,04) \times 10^8$
Выживаемость, % <i>Viability, %</i>	73	73
Морфология колоний <i>Colony morphology</i>	Гладкие круглые колонии <i>Smooth round colonies</i>	Гладкие круглые колонии <i>Smooth round colonies</i>
Биохимическая идентификация <i>Biochemical identification</i>	95,5% (<i>Salmonella enterica</i>)	95,5% (<i>Salmonella enterica</i>)

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

Таблица 2. Результаты теста ускоренного хранения образцов штамма *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 в разных первичных упаковках**Table 2.** Results of accelerated shelf-life testing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 samples in different primary packaging

Температура хранения, °C <i>Storage temperature, °C</i>	Время, ч <i>Time, h</i>	Количество жизнеспособных микробных клеток, КОЕ/мл <i>Viable cell count, CFU/mL</i>					
		Ампулы <i>Ampoules</i>			Флаконы <i>Vials</i>		
		$\bar{X} \pm S$ (n=9)	RSD, %	$\log_{10} X$	$\bar{X} \pm S$ (n=9)	RSD, %	$\log_{10} X$
35	696	$(6,6 \pm 2,2) \times 10^7$	33	7,82	$(4,6 \pm 0,1) \times 10^7$	2	7,66
	960	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^7$	11	7,28	$(7,2 \pm 2,4) \times 10^7$	33	7,86
	1680	$(6,6 \pm 0,2) \times 10^5$	7	5,82	$(3,9 \pm 0,2) \times 10^5$	7	5,82
	2496	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^5$	10	4,52	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^5$	10	5,52
	3000	$(3,3 \pm 0,3) \times 10^4$	27	5,04	$(2,1 \pm 0,3) \times 10^4$	27	5,04
45	48	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^8$	19	8,20	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^8$	5	8,32
	168	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^7$	9	7,43	$(2,6 \pm 0,1) \times 10^7$	5	7,41
	672	$(2,8 \pm 1,2) \times 10^5$	43	5,45	$(1,1 \pm 0,5) \times 10^6$	44	5,04
	840	$(5,6 \pm 1,5) \times 10^4$	26	4,75	$(3,9 \pm 0,4) \times 10^4$	10	4,59
	1008	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^4$	15	4,04	$(2,3 \pm 0,4) \times 10^4$	17	4,36
55	6	$(1,4 \pm 0,3) \times 10^8$	21	8,15	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^8$	6	8,38
	24	$(8,8 \pm 0,2) \times 10^7$	19	7,94	$(8,5 \pm 1,1) \times 10^7$	12	7,93
	48	$(2,7 \pm 0,5) \times 10^7$	20	7,43	$(6,0 \pm 0,7) \times 10^7$	12	7,78
	96	$(1,3 \pm 0,4) \times 10^6$	32	6,11	$(4,3 \pm 1,2) \times 10^5$	28	5,63
	144	$(4,5 \pm 1,1) \times 10^4$	25	4,65	$(2,6 \pm 0,9) \times 10^4$	33	4,41
65	3	$(7,0 \pm 5,7) \times 10^7$	82	7,85	$(9,4 \pm 2,4) \times 10^7$	26	7,97
	16	$(6,7 \pm 4,6) \times 10^6$	68	6,83	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^7$	45	7,20
	24	$(8,0 \pm 3,1) \times 10^5$	39	5,90	$(1,0 \pm 0,5) \times 10^7$	45	7,00
	48	$(2,8 \pm 3,3) \times 10^4$	118	4,45	$(6,5 \pm 3,1) \times 10^4$	48	4,81
	72	$(5,0 \pm 2,1) \times 10^2$	42	2,70	$(4,6 \pm 4,4) \times 10^3$	94	3,66

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

Примечание. $\bar{X} \pm S$ – среднее арифметическое значение \pm стандартное отклонение; *n* – количество результатов испытаний; *RSD* – относительное стандартное отклонение.*Note.* $\bar{X} \pm S$, arithmetic mean \pm standard deviation; *n*, number of test results; *RSD*, relative standard deviation.

Снижения количества жизнеспособных клеток в зависимости от типа первичной упаковки не наблюдалось. В среднем разница между количеством жизнеспособных клеток в ампулах и флаконах составила от 0,01 до 1,1 \log_{10} КОЕ/мл.

На основании полученных данных рассчитаны коэффициенты корреляции и проведен анализ функции снижения количества жизнеспособных клеток в зависимости от типа первичной упаковки, температуры и времени хранения, имеющей линейный вид (табл. 3).

Значения угловых коэффициентов функции снижения количества жизнеспособных клеток от времени сопоставимы для ампул и флаконов при всех изученных температурах. Значения коэффициентов корреляции зависимости для ампул и флаконов составили более 0,9.

Значения констант дезактивации, рассчитанные по формуле (2), представлены в таблице 4. Используя полученные значения, строили график зависимости константы дезактивации от абсолютной температуры.

Используя уравнения прямой (рис. 1), рассчитали константы дезактивации и время снижения количества жизнеспособных клеток при целевых температурах (табл. 5). Целевыми температурами были выбраны 5 и 25 °C: 5 °C – средняя температура хранения лиофилизированных образцов, а 25 °C – вероятная температура транспортировки образцов конечному потребителю.

В режиме реального времени количество жизнеспособных клеток оценивали через полтора года хранения при темпера-

Таблица 3. Характеристики зависимости количества жизнеспособных клеток от времени хранения при повышенных температурах**Table 3.** Viable cell counts depending on the time of storage at elevated temperatures

Температура, °C Temperature, °C	Угловой коэффициент уравнения линейной функции Linear function slope		r*
	Ампулы Ampoules	Флаконы Vials	
35	-0,001	-0,001	0,978
45	-0,004	-0,004	0,988
55	-0,025	-0,030	0,990
65	-0,073	-0,065	0,982

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

Примечание. * r – коэффициент корреляции Пирсона использовали для анализа взаимосвязи между результатами.

Note. * Pearson's correlation coefficient, r, was used to analyse the relationship between the results.

Таблица 4. Результаты расчетов констант дезактивации**Table 4.** Calculation results for viability loss rate constants

Температура хранения, °C Storage temperature, °C	Константа дезактивации Viability loss rate constant (k)		r*	
	Ампулы Ampoules	Флаконы Vials	Ампулы Ampoules	Флаконы Vials
65	$1,18 \times 10^{-1}$	$0,92 \times 10^{-1}$	0,996	0,997
55	$3,06 \times 10^{-2}$	$2,29 \times 10^{-2}$		
45	$5,15 \times 10^{-3}$	$4,77 \times 10^{-3}$		
35	$1,30 \times 10^{-3}$	$1,26 \times 10^{-3}$		

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

Примечание. * r – значение коэффициента корреляции Пирсона уравнения зависимости $\log_{10} k$ от обратной абсолютной температуры $1/T$.Note. * Pearson's correlation coefficient, r, for $\log_{10} k$ values as a function of the inverse absolute temperature, $1/T$.**Таблица 5.** Прогнозирование сроков хранения тест-штамма *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017**Table 5.** Predicting the shelf life of the control strain *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017

Температура хранения, °C Storage temperature, °C	Константа дезактивации Viability loss rate constant		Время снижения количества жизнеспособных клеток до 50%, лет Time to viable cell count reduction to 50%, years		Время снижения количества жизнеспособных клеток до 10%, лет Time to viable cell count reduction to 10%, years	
	Ампулы Ampoules	Флаконы Vials	Ампулы Ampoules	Флаконы Vials	Ампулы Ampoules	Флаконы Vials
25	$2,12 \times 10^{-4}$	$1,99 \times 10^{-4}$	0,2	0,2	0,5	0,5
5*	$4,54 \times 10^{-6}$	$4,43 \times 10^{-6}$	7,6	5,8	25,2	19,3
5**	$6,90 \times 10^{-6}$	$9,50 \times 10^{-6}$	–	–	–	–

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

Примечание. * расчетные данные; ** экспериментальные данные; «–» – не применимо.

Note. *, estimated data; **, experimental data; –, not applicable.

туре 2–8 °C. Концентрация клеток составила $(2,3 \pm 0,1) \times 10^8$ КОЕ/мл в ампулах и $(2,0 \pm 0,3) \times 10^8$ КОЕ/мл во флаконах.

Данные исследования указывают на принципиальную возможность использования закона Аррениуса для прогнозирования гарантийного срока хранения лиофилизированных бактериальных штаммов. Влияние эффекта температуры имеет линейный вид, а значения коэффициентов

аппроксимации (R^2) близки к единице. Отсутствие различий в прогнозируемом времени хранения лиофилизированного тест-штамма, укупоренного во флаконы или ампулы, указывает на возможность использования только одного вида первичной упаковки для проведения теста ускоренного хранения при определении гарантийного срока хранения разных штаммов микроорганизмов. Таким образом, результаты изменения

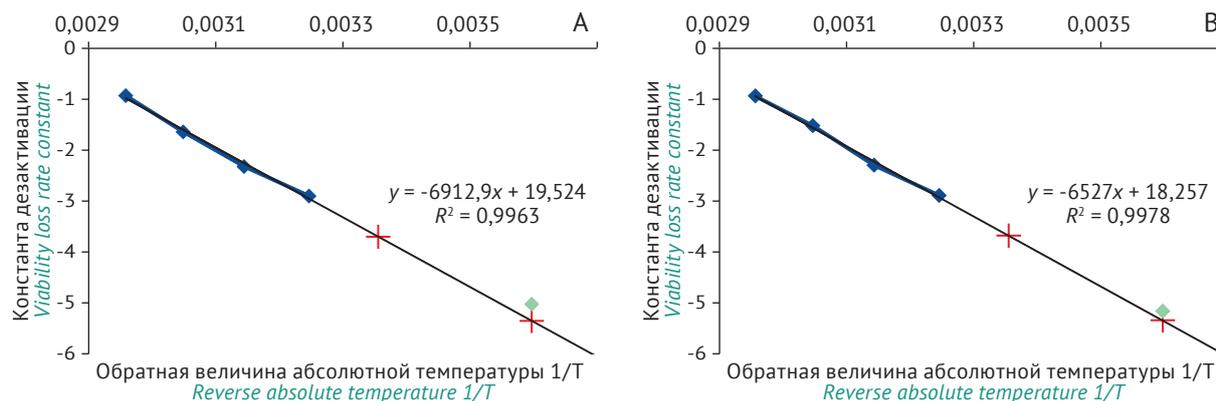


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 1. Зависимость констант дезактивации от обратной абсолютной температуры: А – ампулы, В – флаконы. Синий цвет – экспериментальные данные, полученные при хранении в условиях повышенных температур; красный цвет (значок перекрестия) – рассчитанные константы при 25 и 5 °С; зеленый цвет (значок ромба) – данные, полученные при хранении в режиме реального времени.

Fig. 1. Viability loss rate constants as a function of the inverse absolute temperature: A, ampoules; B, vials. Blue: experimental data obtained in accelerated stability testing at elevated temperatures; red (crosshairs): calculated constants for 25 °C and 5 °C; green (diamonds): data obtained in real-time stability testing.

жизнеспособности штаммов, хранящихся во флаконах, можно экстраполировать на долгосрочное хранение в ампулах. По результатам исследования были выбраны температуры проведения теста ускоренного хранения (35, 45, 55 и 65 °С) и получены ориентировочные скорости снижения количества жизнеспособных клеток. Полученные данные будут использованы для дальнейших исследований. Прогнозируемое время снижения количества жизнеспособных клеток лиофилизированного штамма *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 до 10% составляет 19 лет для флаконов и 25 лет для ампул; до 50% составляет 5,8 года для флаконов и 7,6 года – для ампул.

Данные о сроках хранения штамма *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 целесообразно экстраполировать для прогнозирования сроков хранения других штаммов, поскольку микроорганизмы могут различаться по степени выживаемости после лиофильного высушивания и скорости снижения жизнеспособности со временем. Мы предварительно показали, что снижение жизнеспособности в условиях повышенных температур существенно выше у *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017 по сравнению с *Staphylococcus aureus* NCTC 10788 и *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924 [5]. А.В. Осин и соавт. также получили результаты по прогнозируемым срокам хранения при 4 °С; они выше у *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) – 105 лет, а самые низкие – у *Vibrio cholerae* non-O1 p9741 [12]. Поэтому существует необходимость прогнозирования для каждого рода или штамма в отдельности, что может оказаться крайне затратным.

Для определения сроков хранения различных микроорганизмов мы предлагаем использование следующей схемы: 1) провести стресс-тест при одной повышенной температуре 37 °С различных штаммов микроорганизмов; 2) при стресс-тесте проводить отбор проб через 1 и 3 мес.; 3) рассчитать константы дезактивации при данной температуре по трем точкам; 4) распределить все микроорганизмы на группы: устойчивые, умеренно-устойчивые и неустойчивые; 5) для каждой группы прогнозировать сроки хранения методом ускоренного хранения.

Полученные результаты по снижению количества жизнеспособных клеток на 50% могут быть рекомендованы для установления интервала периодичности проверки жизнеспособности тест-штаммов, хранящихся в ампулах в фондах коллекции, примерно через 7–10 лет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование подтвердило использование разных типов первичной упаковки (флаконы и ампулы) для лиофильного высушивания и хранения тест-штаммов. Выбор первичной упаковки должен быть обусловлен целями использования тест-штаммов – долгосрочное хранение в фондах Государственной коллекции патогенных микроорганизмов или снабжение конечных потребителей.

Полученные данные могут быть использованы для дальнейших исследований и разработки рекомендаций по хранению лиофилизированных бактериальных штаммов в различных типах упаковки.

Литература/References

1. Грачева ИВ, Осин АВ, Кутырев ВВ. Принципы формирования коллекционных фондов штаммов микроорганизмов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(2):16–23. Gracheva IV, Osin AV, Kutuyev VV. Principles of formation of collection funds of microorganism strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(2):16–23 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-16-23>
2. Снатенков ЕА, Агеева НП, Ротов КА, Коваленко АА. Анализ аварийных ситуаций при работе с патогенными биологическими агентами в рамках риск-ориентированного подхода. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022;(2):145–48. Snatenkov EA, Ageeva NP, Rotov KA, Kovalenko AA. Analysis of emergency situations when working with pathogenic biological agents within the framework of risk-oriented approach. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2022;(2):145–48 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-2-145-148>
3. Carraretto AR, Curi EF, Almeida CED, Abatti REM. Glass ampoules: risks and benefits. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011;61(4):513–21. [https://doi.org/10.1016/s0034-7094\(11\)70059-9](https://doi.org/10.1016/s0034-7094(11)70059-9)
4. Peiren J, Hellemans A, De Vos P. Impact of the freeze-drying process on product appearance, residual moisture content, viability, and batch uniformity of freeze-dried bacterial cultures safeguarded at culture collections. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(14):6239–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7359-1>
5. Воропаев АА, Фадейкина ОВ, Ермолаева ТН, Давыдов ДС. Лиофилизация бактериальных тест-штаммов в аппарате коллекторного типа: влияние параметров замораживания и высушивания, объема заполнения ампул и плотности ватного фильтра. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):348–60. Voropaev AA, Fadeikina OV, Ermolaeva TN, Davydov DS. Lyophilisation of bacterial test strains in a manifold-type apparatus: effects of freezing and drying parameters, ampoule fill volume, and cotton filter density. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):348–60 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-348-360>
6. Tsen JH, Lin YP, Huang HY, King VAN. Acceleration storage testing of freeze-dried immobilized *Lactobacillus acidophilus*-fermented banana media. *J Food Process Preserv*. 2007;31(6):688–701. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2007.00160.x>
7. Muntu CM, Avanti C, Hayun H, Surini S. Stability study of spray freeze-dried insulin dry powder formulations used for nose-to-brain delivery. *J Appl Pharm Sci*. 2023;13(10):225–37. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2023.148983>
8. Zhenhe X, Zihan D, Yuanxing Z, Xiaohong L, Qiyao W, Shuai S, Qin L. Shelf-life prediction and storage stability of *Aeromonas bacteriophage* vB_Asm_ZHF. *Virus Research*. 2023;323:198997. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198997>
9. Shalaev E, Ohtake S, Mousa EM, Searles J, Nail S, Roberts CJ. Accelerated storage for shelf-life prediction of lyophiles: temperature dependence of degradation of amorphous small molecular weight drugs and proteins. *J Pharm Sci*. 2023;112(6):1509–22. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.02.008>
10. Ebrahim A, DeVore K, Fischer T. Limitations of accelerated stability model based on the Arrhenius equation for shelf life estimation of *in vitro* diagnostic products. *Clin Chem*. 2021;67(4):684–8. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa282>
11. Mitić S, Otenhajmer I, Damjanović V. Predicting the stabilities of freeze-dried suspensions of *Lactobacillus acidophilus* by the accelerated storage test. *Cryobiology*. 1974;11(2):116–20. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(74\)90300-9](https://doi.org/10.1016/0011-2240(74)90300-9)
12. Осин АВ, Червякова НС, Валова ТВ. Лиофилизация штаммов патогенных микроорганизмов на сублимационных установках разного типа и оценка качества полученных препаратов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(3):66–70. Osin AV, Chervyakova NS, Valova TV. Lyophilization of pathogenic microorganisms strains on freeze-drying modules of different type, and quality assessment of the preparations obtained. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(3):66–70 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-66-70>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.А. Воропаев** – концепция работы, проведение экспериментальной работы, написание текста рукописи, формулировка выводов; **О.Ц. Цыдыпова** – концепция работы, проведение экспериментальной работы; **О.В. Фадейкина** – формулировка выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **Д.С. Давыдов** – концепция работы, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.A. Voropaev** conceptualised the study, conducted the experimental work, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **O.T. Cidipova** conceptualised the study and conducted the experimental work. **O.V. Fadeikina** formulated the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication. **D.S. Davydov** conceptualised the study and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Воропаев Андрей Андреевич / Andrey A. Voropaev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>

Цыдыпова Ольга Цыренжаповна / Olga T. Cidipova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-8893-5932>

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук / Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук / Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>

Поступила 19.09.2024

После доработки 28.10.2024

Принята к публикации 06.12.2024

Received 19 September 2024

Revised 28 October 2024

Accepted 6 December 2024

Благодарности рецензентам Thank you to all our reviewers

Выражаем искреннюю признательность рецензентам, которые оказали неоценимую помощь при подготовке выпусков журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». В 2024 г. объективную оценку и рекомендации авторам поступивших в редакцию рукописей дали:

Агафонов А.П. (Кольцово, Новосибирская обл.)
Аксанина Н.В. (Ростов-на-Дону)
Алексеева И.А. (Москва)
Алешкин А.В. (Москва)
Аракелов С.А. (Санкт-Петербург)
Батрак В.В. (Москва)
Бахрушина Е.О. (Москва)
Бобкова М.Р. (Москва)
Богословская Е.В. (Москва)
Бондарев В.П. (Москва)
Борисевич С.В. (Сергиев Посад, Московская обл.)
Борисова О.Ю. (Москва)
Буркальцева М.В. (Москва)
Васин А.В. (Санкт-Петербург)
Волгарева Г.М. (Москва)
Ворошилова Н.Н. (Уфа)
Гаврилова Л.Б. (Киров)
Гайнанова Г.А. (Казань)
Гасич Е.Л. (Минск, Республика Беларусь)
Гершович П.М. (Санкт-Петербург)
Гончаров А.Е. (Минск, Республика Беларусь)
Дмитриев И.П. (Сент-Луис, штат Миссури, США)
Доронин М.И. (Владимир)
Дугаржапова З.Ф. (Иркутск)
Евлашкина В.Ф. (Москва)
Евсеев В.А. (Кольцово, Новосибирская обл.)
Енукашвили Н.И. (Санкт-Петербург)
Есмагамбетов И.Б. (Москва)
Жукова О.В. (Нижний Новгород)
Захарова Ю.А. (Москва)
Игнатъев Г.М. (Москва)
Каратаев Г.И. (Москва)
Кособокова Е.Н. (Москва)
Коровкин А.С. (Москва)
Кузнецовский А.В. (Киров)
Кузьмина Н.С. (Москва)
Кулябина Е.В. (Москва)
Кюрегян К.К. (Москва)
Лакота Я. (Братислава, Словакия)
Лопухов П.Д. (Москва)
Лягоскин И.В. (Вольгинский, Владимирская обл.)
Максимов Н.Л. (Санкт-Петербург)
Манюшкин А.В. (Сергиев Посад, Московская обл.)
Малоголовкин А.С. (Москва)
Мельникова Е.В. (Москва)
Мионов А.Н. (Москва)
Морозова О.В. (Нижний Новгород)
Мосягин В.Д. (Москва)
Никитин Н.А. (Москва)
Никитюк Н.Ф. (Москва)
Никифоров А.К. (Саратов)
Оксанич А.С. (Москва)
Орлова Н.А. (Москва)
Осин А.В. (Саратов)
Охупкина В.Ю. (Киров)
Поддубиков А.В. (Москва)
Подколзин И.В. (Вольгинский, Владимирская обл.)
Попова В.М. (Москва)
Постнова Е.Л. (Москва)
Потеряев Д.А. (Вольгинский, Владимирская обл.)
Радченко Е.А. (Бишкек, Кыргызская Республика)
Рудометов А.П. (Кольцово, Новосибирская обл.)
Рузанова Э.А. (Санкт-Петербург)
Русанова Д.В. (Ставрополь)
Саканян Е.И. (Москва)
Салимова Е.Л. (Санкт-Петербург)
Сахно Н.Г. (Москва)
Сергеева М.В. (Санкт-Петербург)
Смирнов В.В. (Москва)
Соломко Е.Ю. (Москва)
Стовба Л.Ф. (Сергиев Посад, Московская обл.)
Суханова С.М. (Москва)
Ткаченко Г.А. (Волгоград)
Файзулов Е.Б. (Москва)
Фаустова Н.М. (Кузьмоловский, Ленинградская обл.)
Филиппов А.В. (Киров)
Хаметова К.М. (Москва)
Хамитов Р.А. (Вольгинский, Владимирская обл.)
Черданцев А.П. (Ульяновск)
Швец С.В. (Москва)
Шиловский И.П. (Москва)
Шустов А.В. (Астана, Республика Казахстан)



Услуги ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России осуществляет следующие услуги:

Экспертиза



Экспертная помощь

E-mail:

expert_help@expmed.ru



Ввод в ГО



Ввод в гражданский оборот

E-mail:

osmibp@expmed.ru



Штаммы



Государственная коллекция патогенных микроорганизмов

E-mail:

general@expmed.ru



ФСО



Служба фармакопейных стандартных образцов и фармакопейных исследований

E-mail:

fso@expmed.ru



Трансфер



Центр трансфера медицинских технологий

E-mail:

ctmt@expmed.ru



Обучение



Центр образовательных программ

E-mail:

expert_help@expmed.ru



Приглашаем к сотрудничеству всех заинтересованных представителей фармацевтического сообщества



ISSN 2221-996X



9 772221 996004