

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

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Том / Volume

№ / No.

25

2

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

2025

ТЕМА НОМЕРА

**Тренды контроля качества и стандартизации
биологических лекарственных препаратов**



www.biopreparations.ru



Уважаемые коллеги!

Современная фармацевтическая отрасль переживает период активного развития методологий контроля качества биологических лекарственных препаратов. На первый план выходят такие ключевые тренды, как внедрение риск-ориентированных подходов, гармонизация регуляторных требований, разработка современных аналитических методов. Эти направления становятся особенно актуальными в свете появления высокотехнологичных лекарственных препаратов, требующих принципиально новых решений в области стандартизации.

Главная тема данного выпуска журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» посвящена актуальным научно-практическим решениям в области разработки, аттестации и стандартизации биологических препаратов, объединив исследования, которые вносят вклад в создание национальной системы обеспечения качества. Публикуемые в выпуске материалы отражают современные тенденции в области

контроля качества биологических препаратов и предлагают комплексный подход к решению ключевых задач стандартизации биопрепаратов. Результаты исследований будут полезны и найдут отклик среди разработчиков, производителей и регуляторных органов, работающих над обеспечением качества и доступностью биологических препаратов в России и странах ЕАЭС.

Особое внимание в выпуске уделено применению концепции «качество через дизайн» (Quality by Design, QbD) при разработке генотерапевтических препаратов. Определены принципы QbD в контексте производства аденоассоциированных вирусных векторов для лечения миодистрофии Дюшенна. Важное место занимает обсуждение стандартизации препаратов на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. В контексте совершенствования методов контроля качества рассматривается применение принципов 3Rs (замена, сокращение, усовершенствование) при тестировании АКДС-вакцин. Актуальной проблемой остается совершенствование методов контроля качества традиционных биологических лекарственных препаратов, включая вакцины и иммуноглобулины. Пристального внимания заслуживают вопросы разработки национальных стандартных образцов и внедрения альтернативных методов тестирования, соответствующих международным требованиям. Дополняют выпуск исследования по разработке и валидации методики иммуноферментного анализа для определения антилекарственных антител к трастузумабу и методики для выявления E2 антигена вируса Чикунгунья, демонстрируя междисциплинарный подход к обеспечению качества.

Уверена, что материалы данного выпуска будут способствовать гармонизации регуляторных требований в Российской Федерации, странах ЕАЭС, а также корректировке спектра методов контроля качества препаратов в соответствии с текущими запросами в отрасли.

С уважением,
кандидат биологических наук

ФАДЕЙКИНА Ольга Васильевна

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

ТОМ 25, № 2, 2025

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 «Белый список» научных журналов и 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. 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: Scopus, 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 статей и рецензирование рукописей не взимается.

Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International CC BY 4.0.

VOLUME 25, NO. 2, 2025

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 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: Scopus, 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 articles and reviewing manuscripts.

The content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International licence (CC BY 4.0).

На обложке: 3D-изображение клеток (лицензированное изображение фотобанка ООО «Фотодженика» <https://photogenica.ru/zoom/PHX376768220/>)

Cover image: 3D-rendered cells (a licensed image from the Photogenica image bank <https://photogenica.ru/zoom/PHX376768220/>)

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., академик 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., Латиноамериканский 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. (Москва, Россия)

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

Коровкин Алексей Сергеевич, канд. мед. наук (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)

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» 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. (Москва, Россия)

Мосягин Вячеслав Дмитриевич, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия)

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

Фадеекина Ольга Васильевна, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

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
Фадейкина Ольга Васильевна,
канд. биол. наук

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, издателя 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
100 экз. Цена свободная

Подписано в печать
23.06.2025

Дата выхода в свет
03.07.2025

Подписной индекс
в каталоге «Пресса России» — 57941,
в каталоге агентства «Урал-Пресс» — 57941

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

© Составление. Оформление.
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,
2025

СОДЕРЖАНИЕ

Тема номера:
ТРЕНДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
Е.В. Мельникова, О.А. Рачинская, И.С. Семенова, В.А. Меркулов
Программа контроля качества препаратов на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.....127

Д.С. Копеин, Г.Н. Порошин, Р.А. Хамитов
Реализация концепции Quality by Design для генотерапевтического лекарственного препарата на основе аденоассоциированного вирусного вектора141

Е.И. Комаровская, О.В. Проскурина
Применение принципов 3Rs для оценки качества АКДС-вакцины: преимущества и недостатки156

Е.А. Коновалова, Е.Н. Калинина, Е.С. Кормщикова, Е.В. Росина, С.Е. Зиганшина, К.А. Воробьев, И.В. Парамонов
Лекарственные препараты иммуноглобулина человека против гепатита В: вопросы стандартизации170

Е.И. Комаровская, О.В. Фадейкина, К.А. Лыско, Р.А. Волкова, О.Г. Корнилова
Аттестация фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности адсорбированного столбнячного анатоксина на морских свинках182

А.А. Воропаев, Ю.И. Крысанова, О.В. Фадейкина, Р.М. Валюхова, Д.С. Давыдов
Лиофилизация стандартизированных по количеству жизнеспособных клеток микроорганизмов в низкой концентрации: разработка режима высушивания193

ПРОБИОТИКИ
Н.Б. Перунова, О.В. Бухарин, Е.В. Иванова, А.В. Бекпергенова, Т.А. Бондаренко
Пробиотические свойства композиции индигенных штаммов *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 и *Bifidobacterium longum* ICIS-505 в условиях *in vitro*203

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК
Б. Тахан, Л.Н. Притворова, Т.Г. Самарцева, С.А. Кедик, А.С. Оксанич
Разработка количественной иммуноферментной тест-системы для определения концентрации Е2 антигена вируса Чикунгунья и расчета массы цельновирионного антигена в культуральных образцах214

В.В. Писарев, А.В. Иванов
Детекция антилекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа226

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Editor-in-Chief

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (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., Acad. 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, and gene therapy products, human and animal blood plasma products, as well as various groups of immunomodulatory and cell-based medicinal 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., Acad. RAS, 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

Nikolay I. Briko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. 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., Acad. 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. (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.) (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.), Acad. RAS, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya (Moscow, Russia)

Ekaterina V. Melnikova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

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

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Vyacheslav D. Mosyagin, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

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

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

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

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.)

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, publisher, 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

100 copies. Free price

Passed for printing

23 June 2025

Date of publication

7 July 2025

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, 2025

CONTENTS

Issue topic

TRENDS IN QUALITY CONTROL AND STANDARDISATION OF BIOLOGICALS

E.V. Melnikova, O.A. Rachinskaya, I.S. Semenova, V.A. Merkulov
**Quality control programmes for induced pluripotent
stem cell-derived medicinal products** 127

D.S. Kopein, G.N. Poroshin, R.A. Khamitov
**Implementation of the quality-by-design concept for an adeno-
associated viral vector-based gene therapy**..... 141

E.I. Komarovskaya, O.V. Proskurina
**Application of 3Rs principles to assess the quality of DPT vaccine:
Advantages and disadvantages** 156

E.A. Konovalova, E.N. Kalinina, E.S. Kormshchikova, E.V. Rosina,
S.E. Ziganshina, K.A. Vorobiev, I.V. Paramonov
Human hepatitis B immunoglobulins: Standardisation issues 170

E.I. Komarovskaya, O.V. Fadeikina, K.A. Lysko, R.A. Volkova,
O.G. Kornilova
**Certification of a pharmacopoeial reference standard
for potency testing of adsorbed tetanus toxoid in guinea pigs** 182

A.A. Voropaev, Yu.I. Krysanova, O.V. Fadeikina, R.M. Valyukhova,
D.S. Davydov
**Lyophilization of microorganisms standardized
by the number of viable cells in low concentration:
Development of a drying mode** 193

PROBIOTICS

N.B. Perunova, O.V. Bukharin, E.V. Ivanova, A.V. Bekpergenova,
T.A. Bondarenko
**Probiotic properties of an indigenous strain composition
of *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310
and *Bifidobacterium longum* ICIS-505 *in vitro*** 203

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS

B. Tahhan, L.N. Pritvorova, T.G. Samartseva, S.A. Kedik,
A.S. Oksanich
**Development of an enzyme-linked immunosorbent
assay test system for quantifying Chikungunya virus
E2 protein and calculating the mass of whole-virion antigen
in culture fluid samples**..... 214

V.V. Pisarev, A.V. Ivanov
**Detection of anti-drug antibodies to trastuzumab in serum
by enzyme-linked immunosorbent assay** 226



Программа контроля качества препаратов на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Е.В. Мельникова^{1,✉}, О.А. Рачинская¹, И.С. Семенова¹, В.А. Меркулов^{1,2}

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

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

✉ Мельникова Екатерина Валерьевна; melnikovaev@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время в регуляторной системе отсутствуют гармонизированные единые требования к контролю качества лекарственных препаратов (ЛП) на основе соматических клеток человека (соматотерапевтических ЛП) и тканеинженерных ЛП, в состав которых включены дифференцированные клетки, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). В связи с этим актуальным представляется формирование подходов в рамках регуляторной системы Евразийского экономического союза (ЕАЭС) к разработке программы контроля качества и установлению критических показателей качества ЛП, полученных из ИПСК.

ЦЕЛЬ. Систематизация опыта ведущих мировых регуляторных органов и нормативных требований Евразийского экономического союза для разработки и обоснования программы контроля качества лекарственных препаратов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ. Основными направлениями терапевтического применения ЛП, полученных из ИПСК, являются лечение нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний, сахарного диабета, реакции «трансплантат против хозяина» и офтальмологической патологии. За последнее десятилетие рекомендации и требования к качеству ИПСК клинического уровня были представлены Китайским обществом исследований стволовых клеток, регуляторным органом Японии, Глобальным альянсом по терапии ИПСК (GAIТ), Европейским банком ИПСК (EBiSC). В рамках ЕАЭС требования к качеству генетически модифицированных клеток введены в действие в 2025 г. (глава 32 Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств ЕАЭС»). Перечень критических показателей качества ИПСК клинического уровня, предложенный GAIТ, в целом соответствует регуляторным нормам ЕАЭС и может быть использован при составлении программы контроля качества ЛП на основе ИПСК для применения на территории Российской Федерации и ЕАЭС. Программа контроля качества готового соматотерапевтического или тканеинженерного ЛП, полученного из ИПСК, должна основываться на принципе прослеживаемости характеристик качества начиная с исходного материала. Процедура получения ИПСК является полноценным технологическим процессом, который должен соответствовать правилам надлежащей производственной практики (GMP) для генетически модифицированных клеток. Контроль качества ИПСК должен включать определение специфических показателей, включая следующие: остаточное содержание ДНК-векторов, использованных для перепрограммирования (оценка чистоты); экспрессия маркеров недифференцированного состояния клеток (подтверждение подлинности); тест на плюрипотентность (оценка активности).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Программа контроля качества готовых ЛП, полученных из ИПСК, должна соответствовать типу дифференцированных клеток и учитывать показания к их клиническому применению. Критическими аспектами качества при характеристике ИПСК являются доказательство отсутствия примесных недифференцированных клеток и клеток с новыми иммуногенными эпитопами, подтверждение подлинности и генетической стабильности. Рассмотренные подходы к оценке качества ИПСК могут быть использованы для обоснования стратегии контроля качества ЛП на основе ИПСК, а также для формирования спецификаций при государственной регистрации по правилам ЕАЭС.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; клеточная терапия; соматотерапевтический лекарственный препарат; тканеинженерный лекарственный препарат; перепрограммирование клеток; банк клеток; контроль качества; показатели качества; регуляторные органы

Для цитирования: Мельникова Е.В., Рачинская О.А., Семенова И.С., Меркулов В.А. Программа контроля качества препаратов на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2025;25(2):127–140. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-127-140>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200093-9).

Потенциальный конфликт интересов. Е.В. Мельникова является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2025 г. В.А. Меркулов – главный редактор журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2021 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Quality control programmes for induced pluripotent stem cell-derived medicinal products

Ekaterina V. Melnikova^{1,✉}, Olga A. Rachinskaya¹, Irina S. Semenova¹, Vadim A. Merkulov^{1,2}

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

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

✉ Ekaterina V. Melnikova; melnikovaev@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Currently, there are no harmonised regulatory requirements for the quality control of human somatic cell therapy and tissue-engineered medicinal products that contain differentiated cells derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs). This lack of uniform requirements underscores the need for approaches to developing quality control programmes and establishing critical quality attributes for iPSC-derived medicinal products within the Eurasian Economic Union (EAEU) regulatory framework.

AIM. This study aimed to systematise global regulatory experience and EAEU regulatory requirements for the development and justification of quality control programmes for iPSC-derived medicinal products.

DISCUSSION. Medicinal products derived from iPSCs are mainly used in the treatment of neurodegenerative, cardiovascular, and oncological diseases, diabetes, graft-versus-host disease, and eye diseases. Over the past decade, specific recommendations and requirements for the quality of clinical-grade iPSCs have been published by the Chinese Society for Stem Cell Research (CSSCR), the Japanese Ministry of Health, Labour, and Welfare (MHLW), the Global Alliance for iPSC Therapy (GAIiT), and the European Bank of iPSC (EBiSC). The EAEU regulatory requirements for the quality of genetically modified cells have been in effect since 2025 (Chapter 32

of Decision No. 89 of the Council of the Eurasian Economic Commission “On Approval of the Rules for Assessment of Biological Medicines in the EAEU” of November 3, 2016). The list of critical quality attributes for clinical-grade iPSCs proposed by the GAIT generally corresponds to the EAEU regulatory framework and can be used in drawing up quality control programmes for iPSC-derived medicinal products in the Russian Federation and the EAEU. Quality control programmes for finished somatic cell therapy or tissue-engineered medicinal products derived from iPSCs should be based on the principle of quality attribute traceability from the starting material onwards. The production of iPSCs is a full-fledged production process that must comply with Good Manufacturing Practice (GMP) requirements for genetically modified cells. Specific quality controls for iPSCs should include tests for residual reprogramming vector DNA, markers of the undifferentiated state, and pluripotency as part of purity characterisation, identification, and potency evaluation, respectively.

CONCLUSIONS. A quality control programme for a finished iPSC-derived medicinal product should correspond to the type of differentiated cells and take into account the indications for use. Critical quality considerations for iPSC characterisation include demonstrating the absence of contaminating undifferentiated cells or cells with new immunogenic epitopes and confirming the identity and genetic stability of iPSCs. The considered quality assessment approaches provide a basis for developing both quality control strategies for iPSC-derived medicinal products and specifications for marketing authorisation according to the EAEU requirements.

Keywords: induced pluripotent stem cells; cell therapy; somatic cell therapy medicinal product; tissue-engineered medicinal product; cell reprogramming; cell bank; quality control; quality attributes; regulatory authorities

For citation: Melnikova E.V., Rachinskaya O.A., Semenova I.S., Merkulov V.A. Quality control programmes for induced pluripotent stem cell-derived medicinal products. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(2):127–140. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-127-140>

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. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022200093-9).

Disclosure. E.V. Melnikova has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2025. 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

Применение клеточной терапии как инновационного подхода к лечению тяжелых жизнеугрожающих, социально значимых заболеваний, для которых отсутствуют эффективные доступные лекарственные препараты (ЛП), ограничивается невозможностью выделить определенные типы клеток или их несоответствием требованиям качества вследствие прежде всего наличия мутаций в геноме, что не позволяет их использовать для производства препарата. Вариантом решения проблем является применение в качестве исходного материала индуцированных плюрипотентных столовых клеток (ИПСК). Исследования последних лет направлены на получение ИПСК для клинического применения (ИПСК «клинического уровня», *clinical grade iPSCs*) и создания банков клеток для дальнейшего производства препаратов клеточной терапии [1–7]. Направлениями клинического использования ИПСК и полученных на их основе определенных типов дифференцированных клеток являются нейродегенеративные [8–11], сердечно-сосудистые [9, 12], онкологические заболевания [9, 13],

диабет [14, 15], реакция «трансплантат против хозяина» [16] и заболевания глаз [9, 17].

В настоящее время в мировой регуляторной системе отсутствуют гармонизированные единые требования к контролю качества ЛП на основе соматических клеток человека (соматотерапевтических ЛП) и тканеинженерных ЛП, в состав которых включены дифференцированные клетки, полученные из ИПСК. Это объясняется сравнительно недавним открытием механизма клеточного перепрограммирования, недостаточностью сведений о безопасности направленных изменений эпигенетического профиля клеток, экономически затратным процессом получения и аттестации аутологичных ИПСК, ограниченностью данных по характеристике ИПСК при их хранении в банке клеток (банкирование), а также отсутствием разрешенных к медицинскому применению ЛП на основе ИПСК и подходов к экспертизе представленных материалов для государственной регистрации. В Российской Федерации отмечается отсутствие значительного опыта работы с ИПСК клинического уровня, включая их характеризацию

и хранение в Коллекциях клеточных культур, а также подходов к их экспертной оценке.

Цель работы – систематизация опыта ведущих мировых регуляторных органов и нормативных требований Евразийского экономического союза (ЕАЭС) для разработки и обоснования программы контроля качества лекарственных препаратов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

Поиск информации об актуальных клинических исследованиях ЛП на основе ИПСК проводили с помощью реестра клинических исследований (КИ) ClinicalTrials.gov (ключевое слово: «induced pluripotent stem cell»; статус КИ: все, за исключением «unknown» и «withdrawn»). Поиск научных публикаций проводили с использованием базы данных PubMed по ключевым словам: «induced pluripotent stem cell», «clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines», «pluripotent stem cell-specific quality control».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Международные подходы к контролю качества индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

В настоящее время КИ препаратов, полученных из ИПСК, проводятся преимущественно в США, Китае и Японии (*табл. S1*, опубликована на сайте журнала¹).

Необходимо отметить, что в Китае все препараты на основе стволовых клеток, включая полученные из ИПСК, используются в рамках медицинских технологий без государственной регистрации. КИ в Китае, информация о которых размещена на сайте ClinicalTrials.gov, являются исследованиями, инициированными исследователями (investigator initiated trials, ИИТ), которые проводятся не для целей государственной регистрации [18].

Китай

В 2021 г. экспертами Китайского общества исследований стволовых клеток (Chinese Society for Stem Cell Research) был разработан документ – Requirements for Human-Induced Pluripotent Stem Cells («Требования к индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам человека для клинического использования»), который регламентирует технические требования, методы испытаний и инструкции по использованию, маркировке, упаковке, хранению и транспортировке ИПСК при их производстве и контроле качества (*табл. 1*) [19].

Учитывая сложность процесса получения ИПСК, использование аллогенных клеток в качестве исходного материала становится экономически целесообразным решением при создании банков клеток клинического уровня. В данном случае ключевое значение приобретает задача обеспечения иммунологической совместимости. Для снижения иммуногенности применяются следующие подходы:

- получение ИПСК от доноров с гомозиготными гаплотипами главного комплекса гистосовместимости (HLA);
- модификация ИПСК для подавления экспрессии HLA, что позволяет решить проблему тканевого несоответствия между HLA донора и пациента [2, 20].

Модифицированные клеточные линии ИПСК можно отнести к универсальному источнику получения препаратов для клеточной терапии, обеспечивающему значительное сокращение сроков ожидания лечения, устранение потребности в подборе подходящего донора и необходимость предшествующей иммуносупрессивной терапии. Такой подход оказывается существенно более экономичным вариантом терапии по сравнению с использованием аутологичных ИПСК [4].

Возникновение иммуногенности дифференцированных клеток, полученных из ИПСК, может быть связано с появлением новых иммуногенных эпитопов на этапе получения ИПСК вследствие спонтанных мутаций, происходящих в митохондриальной ДНК в процессе клеточного перепрограммирования. По этой причине рекомендуется проводить генетический анализ на различных этапах производства ЛП на основе ИПСК [9, 21].

Анализ чистоты (оценка примесей) включает определение остаточного содержания ДНК транскрипционных факторов, которые могут способствовать возникновению опухолей. Этот риск характерен именно для ИПСК. Установлено, что все четыре ключевых фактора перепрограммирования Яманаки (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) обладают потенциалом вызывать образование опухолей. c-Myc является одним из наиболее часто мутирующих генов при онкологических заболеваниях, и мутация в нем может выступать как драйверная мутация, предоставляя преимущество в пролиферации и селекции клонов опухолевых клеток [22].

В работе J. Wu с соавт. [23] представлена программа контроля качества и критерии приемлемости на стадиях производства ИПСК

¹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-127-140-table-s1>

Таблица 1. Контроль качества индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК)

Table 1. Quality control of induced pluripotent stem cells (iPSCs)

Характеристика <i>Attribute</i>	Методы анализа <i>Test methods</i>	Нормы <i>Requirements</i>
Подлинность – морфологический анализ <i>Identity: morphological analysis</i>	Микроскопия <i>Microscopy</i>	Клетки, культивируемые в 2D-условиях, должны образовывать компактные колонии с четкими границами и характеризоваться схожей морфологией и наличием плотных межклеточных контактов <i>Cells grown in 2D conditions should form compact colonies with clear edges, be similar in morphology, and have a dense intercellular communication network</i>
Подлинность – кариотип <i>Identity: karyotype</i>	Дифференциальное G-окрашивание <i>Differential G-banding</i>	Нормальный кариотип 46,XX или 46,XY <i>The normal karyotype is 46,XX or 46,XY</i>
Жизнеспособность <i>Viability</i>	Подсчет клеток в гемоцитометре при окраске трипановым синим <i>Haemocytometer counting with trypan blue staining</i>	Жизнеспособность клеток $\geq 90\%$ до криоконсервации и $\geq 60\%$ после криоконсервации при подсчете в двух повторях с последующим расчетом среднего значения. Разница между результатами подсчетов не должна превышать 10% от среднего арифметического <i>Cell viability should be $\geq 90\%$ before cryopreservation and $\geq 60\%$ after cryopreservation, with cell counting in two runs, followed by the calculation of the mean value. The difference between the calculation results should not exceed 10% of their arithmetic mean</i>
Подлинность – маркеры клеточной популяции <i>Identity: cell surface markers</i>	Проточная цитометрия <i>Flow cytometry</i>	Уровень экспрессии, по крайней мере, двух поверхностных клеточных маркеров (SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81) в популяции клеток должен составлять $\geq 70\%$, уровень экспрессии внутриклеточных маркеров Oct4 и Nanog должен составлять $\geq 70\%$ <i>The expression of at least two of the surface cell markers SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 and TRA-1-81 in the cell population should be $\geq 70\%$, and the expression of the intracellular markers Oct4 and Nanog should be $\geq 70\%$</i>
Чистота – остаточное содержание ДНК транскрипционных факторов <i>Purity: residual amounts of transcription factor DNA</i>	Количественный ПЦР-анализ <i>Quantitative PCR analysis</i>	Расчет концентрации целевых генов производится в соответствии с построенной стандартной кривой при использовании эталонных стандартов ДНК целевых генов <i>The concentration of target genes is calculated according to the standard curve plotted using reference standards for the DNA of target genes</i>
Тест на плюрипотентность <i>Pluripotency test</i>	Формирование тератомы <i>in vivo</i> на иммунодефицитных мышах <i>In vivo teratoma formation in immunodeficient mice</i>	ИПСК должны быть способны образовывать <i>in vivo</i> тератомы с производными всех трех зародышевых листков после введения клеток (подкожно, внутримышечно, в пространство семенных канальцев под оболочкой яичек или под почечной капсулой) с последующим гистологическим исследованием при окрашивании препарата гематоксилином и эозином (через 6–10 нед. после образования тератом) <i>iPSCs should be able to form in vivo teratomas with derivatives of all three germ layers after administration of iPSCs (subcutaneous, intramuscular, into the space of the seminal tubules under the testicular membrane, or under the renal capsule), followed by histological examination with haematoxylin and eosin staining (6–10 weeks after teratoma formation)</i>
Стерильность Микоплазма Занесенные агенты <i>Sterility Mycoplasma Adventitious agents</i>	Фармакопейные методы <i>Compendial methods</i>	Проверка донорского материала на наличие вируса иммунодефицита человека, вирусов гепатита В и гепатита С, Т-лимфотропного вируса человека, вируса Эпштейна – Барр, цитомегаловируса и возбудителя сифилиса осуществляется на стадии скрининга доноров. Клетки должны быть стерильными, не содержать бактерий, грибов, микоплазм, вирусов <i>The donor material should be checked for the presence of human immunodeficiency virus, hepatitis B and hepatitis C viruses, human T-lymphotropic virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and Treponema pallidum agent at the screening stage of donors. Cells should be sterile and free of bacteria, fungi, mycoplasmas, and viruses</i>
Аутентификация (внутрипроизводственный контроль) <i>Authentication (in-process control)</i>	Метод коротких tandemных повторов <i>Short tandem repeat analysis</i>	Соответствие STR-профилей ИПСК и материала донора <i>STR profiles of iPSCs and donor material should correspond to each other</i>

Таблица составлена авторами по данным [19] / The table is prepared by the authors using data from [19]

Примечание. ПЦР – полимеразная цепная реакция; STR – метод коротких tandemных повторов.

Note. PCR, polymerase chain reaction; STR, short tandem repeat.

для всех промежуточных продуктов, используемых при получении островков поджелудочной железы с целью лечения пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Программа включает контроль качества следующих типов клеток: стволовых клеток энтодермы, прогениторных клеток поджелудочной железы (ПЖ), эндокринных прогениторных клеток и собственно островковых клеток (активное вещество) (рис. S1, опубликован на сайте журнала²).

ИПСК получали из мононуклеарных клеток периферической крови при использовании набора факторов (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc). Затем были отобраны и охарактеризованы два клона на 10 пассаже, из которых были получены стволовые клетки энтодермы, для которых на 20 пассаже с использованием метода полногеномного секвенирования было подтверждено отсутствие известных онкогенных мутаций. Генетическую стабильность определяли с использованием кариотипирования. Безопасность, связанную с отсутствием примеси ИПСК, оценивали на животных моделях по образованию тератом. Продукты, полученные на промежуточных этапах производства, – прогениторные клетки ПЖ и эндокринные прогениторные клетки оценивали согласно сокращенному контролю качества, определяя подлинность и отсутствие микроорганизмов (тесты на стерильность, микоплазмы, занесенные агенты, бактериальные эндотоксины). Активное вещество (островковые клетки) комплексно характеризовалось по следующим показателям: подлинность (определение основных типов целевых и нецелевых клеток); активность – по секреции инсулина (С-пептида) после стимулирования глюкозой; на отсутствие микроорганизмов.

Япония

В Японии проводятся исследования (стадия ИТ) препаратов, полученных из ИПСК, для лечения различных заболеваний: пигментный ретинит (jRCTa050200027), амавроз Лебера (jRCTa050210178, jRCTa050200122, jRCTa050190084), онкологические (jRCTa030220741) и сердечно-сосудистые заболевания (jRCTa032200189), повреждения хряща коленного сустава (jRCTa050190104) и спинного мозга (jRCTa031190228) [24]. В 2013 г. в Японии было выпущено руководство по оценке качества и проведению необходимых доклинических исследований для после-

дующего клинического применения клеток пигментного эпителия сетчатки, полученных из ИПСК. Согласно руководству определены показания для применения препарата: возрастная макулярная дегенерация сетчатки, дегенеративная миопия, болезнь Штаргардта, травматические повреждения, пигментный ретинит³.

В данном руководстве представлены требования к качеству клеток, касающиеся, прежде всего, эффективности и специфической безопасности (оценка примесей), а также описаны показатели, методы и маркеры (рис. 1).

Критические показатели качества для индуцированных плюрипотентных стволовых клеток клинического уровня

В 2018 г. Глобальным альянсом по терапии ИПСК (Global Alliance for iPSC Therapies, GAiT [20]) был определен минимальный набор критериев для контроля качества и критические показатели качества ИПСК клинического уровня, предназначенных для использования в качестве исходного материала для получения препаратов клеточной терапии, подлежащих банкированию [1]. Данные рекомендации основаны на тщательном анализе значимости этих показателей с точки зрения информации о потенциальном риске, связанном с клиническим применением ИПСК, а также направлены на формирование полного понимания возможных последствий, которые могут возникнуть при тестировании (табл. S2, опубликована на сайте журнала⁴, [25–29]).

Для оценки показателей качества ИПСК таблица S2 дополнена указаниями на действующие фармакопейные статьи Государственной фармакопеи Российской Федерации и фармакопеи ЕАЭС, а также на другие источники, регламентирующие оценку в случае нефармакопейных методов анализа.

Дополнительно на промежуточных этапах получения ИПСК для их характеристики возможно применение расширенного спектра методов для описания и тестирования, включая следующие:

- подробное описание условий культивирования, определение пролиферативной активности ИПСК;
- методы подтверждения генетической стабильности, учитывающие повышенный риск образования мутаций вследствие процессов перепрограммирования клеток, например: исследование однонуклеотидного

² <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-127-140-fig-s1>

³ Guidance on Evaluation of Autologous Induced Pluripotent Stem Cells-derived Retinal Pigment Epithelial Cells. Pharmaceutical and Food Safety Bureau. Ministry of Health, Labour and Welfare. Japan; 2013.

⁴ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-127-140-table-s2>

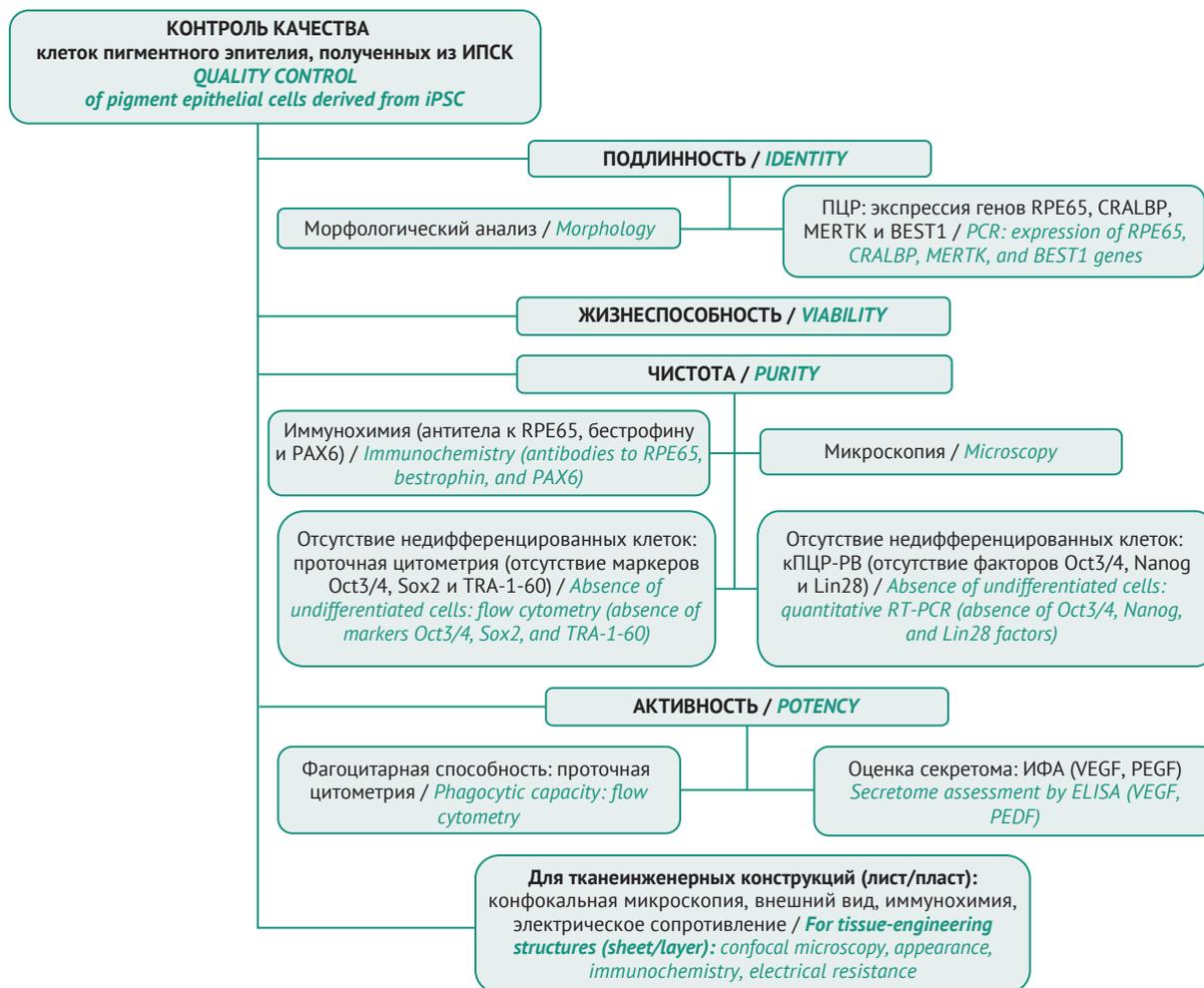


Рисунок подготовлен авторами по материалам Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan⁵ / The figure is prepared by the authors using materials of the Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan⁵

Рис. 1. Необходимый перечень показателей качества для клеток пигментного эпителия, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) согласно требованиям регуляторных органов Японии.

Fig. 1. Quality attributes for pigment epithelial cells derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs), as listed in the requirements of the Japanese regulatory authorities.

Примечание. кПЦР-РВ – количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени; ИФА – иммуноферментный анализ; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; PEDF – фактор пигментного эпителия.

Note. RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; VEGF, vascular endothelial growth factor; PEDF, pigment epithelium-derived factor.

полиморфизма (single nucleotide polymorphism, SNP-анализ), позволяющего обнаруживать субхромосомные изменения и нейтральную потерю гетерозиготности, что может свидетельствовать о клеточной трансформации; применение полногеномного/полноэкзомного секвенирования для определения локусов возможной полной/частичной интеграции векторов перепрограммирования, ассоциированных с риском образования опухолей, и других генетических маркеров в соответствии

с международной базой данных соматических мутаций в опухолях COSMIC, содержащей сведения об известных онкогенах и супрессорных генах опухолей⁶, классифицируемых согласно рекомендациям Американского колледжа медицинской генетики и геномики (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) [30];

– иммуноцитохимическое определение маркеров, специфичных для плюрипотентных стволовых клеток человека;

⁵ Guidance on Evaluation of Autologous Induced Pluripotent Stem Cells-derived Retinal Pigment Epithelial Cells. Pharmaceutical and Food Safety Bureau. Ministry of Health, Labour and Welfare. Japan; 2013.

⁶ COSMIC. Catalogue of somatic mutations in cancer. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

– анализ экспрессии генов с использованием молекулярных матриц, мРНК-матриц или РНК-seq, что позволяет прогнозировать функциональную плюрипотентность.

Впоследствии стратегия контроля качества, предложенная GAIT для характеристики ИПСК клинического уровня с целью дальнейшего включения в коллекции и банки, была адаптирована Европейским банком индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (European bank for induced pluripotent stem cells, EBiSC) [7], а также конкретными медицинскими центрами, специализирующимися на производстве препаратов генной и клеточной терапии в соответствии с требованиями правил надлежащей производственной практики (good manufacturing practice, GMP) [4, 5, 31].

С целью стандартизации процесса EBiSC предложены рекомендации для характеристики ИПСК при создании банков клеток клинического уровня [7]. Согласно данным рекомендациям необходимо проведение оценки безопасности на первичных клетках, на ранних пассажах клеточной линии после перепрограммирования и на клеточной линии ИПСК для включения в банк клеток с помощью следующих методов: аутентификация клеточной линии (STR-профиль, short tandem repeat profile), анализ генетической стабильности (G-бэндинг, SNP или сравнительная геномная гибридизация), анализ на стерильность и отсутствие микоплазмы. Такой подход к контролю качества донорского материала и промежуточных этапов производства ИПСК позволяет накопить надежный массив исторических данных, необходимых для обоснования объема текущего контроля качества (например, проверка вирусной безопасности полученных клеточных линий проводится лишь при отсутствии результатов тестирования донора) и оценки любых изменений процесса производства. В случае прямого перепрограммирования клеток рекомендуется проверять собранные первичные образцы и/или полученные популяции клеток на стерильность и наличие вирусных агентов, а также подтверждать идентичность клеточной линии (принадлежность конкретному человеку).

Наличие результатов генетического тестирования первичных клеток (например, кариотип, SNP-профиль), позволяет в последующем выявить врожденные генетические аномалии и любые отклонения, возникшие непосредственно в ходе перепрограммирования.

Подтверждение подлинности, активности и чистоты ИПСК рекомендуется выполнять на предназначенных для включения в банк клетках и перед получением дифференцированных

клеток для готового ЛП. При этом необходимо проводить количественное определение жизнеспособных клеток, оценку экспрессии маркеров недифференцированных ИПСК, тест на плюрипотентность и др. Морфологический анализ рекомендуется выполнять для всех объектов при получении ИПСК, в том числе для первичных клеток и в ходе рутинного культивирования, в связи с высокой степенью вероятности изменения морфологии клеток, что может произойти в случае микробной контаминации или вследствие появления генетических мутаций.

Для рутинного мониторинга при культивировании рекомендованы следующие условия и периодичность:

- определение STR-профиля: каждые 6–8 нед. или 10–12 пассажей на линиях клеток в культуре;
- оценка генетической стабильности: каждые 6 нед. или 10 пассажей, а также после проведения селекции или при появлении изменений в морфологии и скорости роста клеток в культуре;
- визуальная оценка стерильности: ежедневно;
- тестирование на присутствие микоплазм: каждые 3–4 нед. или 5–6 пассажей, а также при появлении изменений в морфологии и скорости роста клеток в культуре;
- оценка морфологии: ежедневно;
- определение экспрессии специфических маркеров и тест на плюрипотентность: при появлении изменений в морфологии и скорости роста клеток в культуре.

Согласно данным J.J. Novoa с соавт. [4, 5], предложенная стратегия контроля качества [1] позволяет охарактеризовать ИПСК по необходимым показателям безопасности и эффективности для их последующего хранения в банках клеток. Авторы провели валидацию методик контроля качества, специфичных для ИПСК, для определения:

- остаточного содержания ДНК-векторов, использованных для перепрограммирования (оценка чистоты);
- маркеров недифференцированного состояния клеток (подтверждение подлинности);
- плюрипотентности (оценка активности).

Одним из основных этапов внутрипроизводственного контроля ИПСК является оценка безопасности, включающая проверку опухолевого потенциала [4, 5]. Это исследование предусматривает анализ уровня остаточного содержания ДНК-векторов, использованных для перепрограммирования, и установление оптимального минимального числа пассажей клеточной линии, позволяющего оценить

стабильность генома клеток для последующего включения ИПСК в банк и клинического использования. В работе J.J. Novoa с соавт. [4, 5] показано, что скрининг на присутствие остаточных ДНК-векторов в эписомальной форме наиболее целесообразно осуществлять между восьмым и десятым пассажами. Это позволит одновременно исключить клеточные линии, содержащие векторы в эписомальной форме, оптимизировать число пассажей для снижения потенциального риска неблагоприятного воздействия на целостность генома и минимизировать объем выбраковываемых клеточных линий ИПСК.

Для анализа ДНК-векторов было установлено минимальное количество клеток в образце – 20000 клеток (120 нг геномной ДНК). Поскольку используемые ДНК-векторы содержат регуляторный элемент EBNA-1 вируса Эпштейна – Барр, необходимо проводить дополнительное тестирование донора на наличие инфекции данным вирусом и антител к нему. Положительный результат такого теста требует дополнительного исследования материала донора на выявление маркера BNRF1 вируса Эпштейна – Барр. Этот подход позволит дифференцировать эндогенную вирусную инфекцию Эпштейна – Барр от введенного во время перепрограммирования ИПСК элемента EBNA-1. Кроме того, рекомендуется проводить полногеномное секвенирование клеточных линий ИПСК, предназначенных для хранения в банке клеток, что позволит выявить возможную интеграцию фрагментов плазмидных последовательностей, лишенных последовательности EBNA-1 [5].

Оценка потенциала дифференцировки ИПСК в направлении трех зародышевых листков осуществляется посредством теста на функциональную плюрипотентность, который выполняется с применением покровных стекол и конфокальной микроскопии, обеспечивая морфологический анализ и оценку экспрессии маркеров, специфичных для линии. Согласно результатам исследования J.J. Novoa с соавт. [4], полученные ими клеточные линии ИПСК продемонстрировали способность к дифференцировке во всех направлениях: панкреатические

островки (энтодерма); почечные органоиды и кардиомиоциты (мезодерма); кератиноциты, ГАМКергические интернейроны и органоиды внутреннего уха (эктодерма). Оценка экспрессии маркеров недифференцированного состояния клеток проводилась с использованием трех типов маркеров: двух внеклеточных (SSEA4 и TRA-1-60) и одного внутриклеточного (Oct3/4) [5].

Требования к контролю качества индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в соответствии с нормативной документацией ЕАЭС

Исходное сырье и материалы

Нормативно-правовое обеспечение контроля качества ЛП, полученных из ИПСК, осуществляется на протяжении всего жизненного цикла продукции начиная с этапа разработки в строгом соответствии с требованиями документации ЕАЭС⁷. Уточненные требования к разработке, контролю качества, проведению доклинических и клинических исследований ЛП на основе соматических и генетически модифицированных (ГМ) клеток были утверждены в 2025 г. главами 31 и 32 к Решению Совета Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) № 89⁸ (далее – Решение Совета ЕЭК № 89). Эти положения полностью гармонизированы с европейскими требованиями⁹. Согласно этим требованиям ГМ клетки разрабатываются с целью терапевтического применения (ГТЛП) или в производственных целях при разработке продукта клеточной терапии или тканевой инженерии (например, для создания ИПСК, которые впоследствии дифференцируются в соматотерапевтические ЛП или тканеинженерные ЛП). При этом в отношении ЛП, созданных на основе ИПСК, принципы GMP и научно обоснованные рекомендации применяются последовательно начиная с этапа заготовки клеток, включая создание ИПСК и последующие этапы отбора. Программа контроля качества таких препаратов должна включать все этапы производственного процесса: контроль сырья для получения ИПСК, контроль самих ИПСК, промежуточных продуктов производства, активной фармацевтической субстанции (АФС) и готового препарата.

⁷ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

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

⁸ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 22.01.2025 № 13 «О внесении изменений в Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

⁹ Guideline on human cell-based medicinal products (EMA/CHMP/410869/2006). EMA; 2008.

Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells. (EMA/CAT/GTWP/671639/2008). EMA; 2020.

Получение ИПСК предполагает использование следующих исходных компонентов: факторы, обеспечивающие модификацию (перепрограммирование) клеток; средства доставки факторов (плазмидные, вирусные векторы и др.); первичные клетки человека.

Контроль качества процесса получения ИПСК включает следующие ключевые аспекты:

- верификация состава комбинации факторов для модификации (включая коммерчески доступные наборы). Перед использованием факторы должны пройти стерилизацию и проверку на отсутствие вирусной контаминации, в том числе репликационно-компетентных вирусов в случае использования вирусных векторов в качестве средств доставки факторов;
- характеристика первичных клеток и ГМ клеток (ИПСК) по следующим показателям: жизнеспособность клеток, концентрация, чистота (остаточное содержание ДНК транскрипционных факторов, другие примеси), стерильность, активность (тест на плюрипотентность). Подтверждение подлинности (идентификация) должно выполняться с использованием соответствующих генотипических и/или фенотипических маркеров. Эти показатели соответствуют критическим критериям качества для ИПСК клинического уровня как исходного материала для получения препаратов клеточной терапии, предложенным GAIT [1];
- создание главного банка ГМ клеток (ИПСК) должно быть осуществлено до начала I фазы КИ (согласно главе 1 Решения Совета ЕЭК № 89);
- проведение оценки безопасности исходных материалов (донорский материал, ИПСК) относительно возможного присутствия посторонних агентов и подтверждение генетической стабильности;
- проведение оценки характеристик клеток (ИПСК, ЛП на основе ИПСК) до и после генетической модификации, а также после процедуры криоконсервации (заморозка и хранение).

Характеризация банков клеток

Общие требования к характеристике банков клеток описаны в главе 1 Решения Совета ЕЭК № 89 и представлены на рисунке 2. Эти требования могут применяться для характеристики банков ИПСК, принимая во внимание необходимость оценки генетической стабильности, полногеномного и полноэкзомного секвенирования

для выявления мутаций. Необходимо подтверждение состояния плюрипотентности клеток для обоснования дальнейшего использования конкретных типов дифференцированных клеток. Важнейший аспект – подтверждение генетической стабильности ИПСК, так как это является основой для определения предельного возраста клеток *in vitro*, используемых в производстве. Это исследование может проводиться при оценке морфологических характеристик, параметров роста, биохимических, иммунологических, генотипических, фенотипических маркеров.

Так как банк ГМ клеток (ИПСК) формируется после их получения из соматических клеток путем генетической модификации, необходимо установить полный перечень показателей, определяемых для готового препарата на основе этих клеток, включая оценку наличия примесей, характерных для конкретного процесса производства. Особое внимание необходимо уделить определению остаточного содержания ДНК факторов перепрограммирования и средств их доставки (плазмидный, вирусный вектор или др.).

Сведения регистрационного досье

В соответствии с положениями главы 14 Решения Совета ЕЭК № 89 (требования для получения разрешения на проведение КИ) и Решения Совета ЕЭК № 78 (требования для формирования модуля 3 регистрационного досье) необходимо представить описание процесса производства биологического ЛП (включая ЛП на основе ИПСК), которое должно включать описание критических стадий, пределы и диапазоны показателей качества, критические параметры, влияющие на важнейшие характеристики (подлинность, чистота, биологическая активность, количественное содержание, стабильность), результаты валидации процесса производства (для I–II фаз КИ полные сведения могут отсутствовать)¹⁰.

Необходимо представить результаты исследований сопоставимости ЛП, например при изменениях в клеточном исходном материале (источник клеток, метод выделения требуемой(ых) субпопуляции(й) клеток, введение стадии замораживания клеточного материала и др.) или в производственном процессе АФС или ЛП.

Документация на готовый ЛП на основе ИПСК должна содержать подробное обоснование всех показателей качества, предусмотренных спецификацией для АФС и готового продукта,

¹⁰ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

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

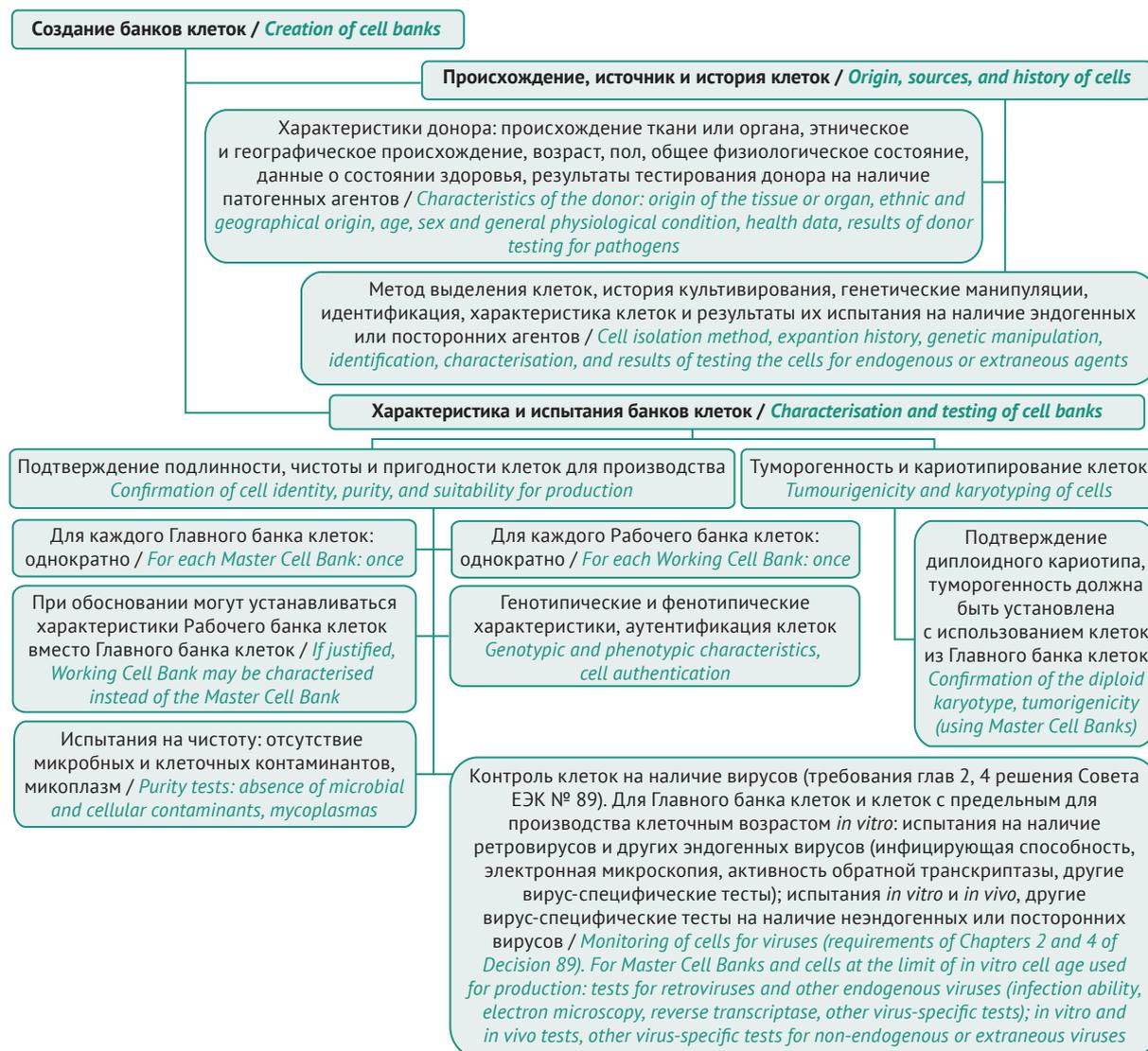


Рисунок подготовлен авторами по данным Решения Совета ЕЭК № 89 / The figure is prepared by the authors using Decision No. 89 of the Council of the Eurasian Economic Commission

Рис. 2. Общие аспекты характеризации банков клеток.

Fig. 2. General aspects of cell bank characterisation.

а также критериев приемлемости (допустимых значений) по следующим параметрам: чистота продукта, содержание примесей (предельное содержание с точки зрения клинической безопасности), биологическая активность и другие критические параметры качества, влияющие на функциональные свойства препарата.

Важным аспектом является релевантность аналитических методик контроля качества, подтверждающих их пригодность. При подаче документов на разрешение проведения I фазы КИ требуется предоставить информацию в виде таблицы, содержащей установленные

пределы приемлемости и параметры валидации. Для II–III фаз КИ необходимо представить резюме результатов валидации. При государственной регистрации необходим полный пакет данных о валидации методик контроля качества¹¹.

Результаты исследования стабильности ЛП на основе ИПСК, а также информация о предполагаемых сроках годности и условиях хранения должны быть представлены отдельно для АФС, ЛП и промежуточных продуктов, которые подвергаются длительному хранению в ходе производственного процесса. Критическими показателями качества, которые требуют

¹¹ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

обязательного определения в рамках исследований стабильности ЛП, являются подлинность, биологическая активность и количественное содержание. Для получения разрешения на проведение КИ необходимо представить данные по стабильности, как минимум, одной серии, произведенной согласно технологическому процессу производства, который будет использоваться для производства препаратов для КИ. Допустимо представление данных по стабильности серий, изготовленных в период разработки или с использованием предыдущей версии технологического процесса, при условии соответствия качества указанных серий уровню качества препарата, планируемого к применению в КИ.

Программа контроля качества и состава спецификации ЛП на основе ИПСК в соответствии с п. 17.3 Решения Совета ЕЭК № 78 по специальным требованиям к модулю 3 регистрационного досье на соматотерапевтические ЛП и ЛП на основе ГМ клеток должна включать следующие аспекты:

- модуль 3 регистрационного досье должен содержать резюме о получении, заготовке и испытании тканей и клеток человека (включая исходные материалы, используемые для получения ИПСК);
- должна быть представлена стратегия пулирования в случае объединения аллогенных клеток после стадии дифференцировки из ИПСК (поскольку пулирование ИПСК до настоящего времени не применялось ввиду повышенного риска генетической нестабильности) и информация о мерах по обеспечению прослеживаемости;
- необходимо учитывать вариабельность исходных материалов для прогнозирования направления терапевтического применения и оценки активности, а также источник происхождения первичных клеток, поскольку установлено, что ИПСК сохраняют «эпигенетическую память» [32, 33]. Так, показано, что ИПСК, полученные из фетальных нейральных стволовых клеток, формировали большее количество нейральных предшественников и дифференцированных нейрональных клеток по сравнению с ИПСК, полученными из фибробластов [34]; ИПСК, полученные из кератиноцитов, чаще формировали нейроэктодермальные структуры по сравнению с ИПСК, полученными из фибробластов [35];
- необходимо представить данные о валидации процесса производства и методах контроля качества, описании и квалификации банков клеток ИПСК;
- контроль качества готового соматотерапевтического ЛП на основе ИПСК должен включать

следующие показатели: подлинность, чистота (стерильность, присутствие микоплазмы, бактериальных эндотоксинов, посторонних агентов и клеточных контаминантов), жизнеспособность, активность, кариологический профиль, туморогенность, пригодность для предполагаемого медицинского применения, подтверждение генетической стабильности, содержание производственных и родственных примесей. Особое внимание уделяется наличию остаточных количеств недифференцированных ИПСК, клеток с новыми иммуногенными эпитопами и других промежуточных продуктов, появляющихся на этапах перепрограммирования, культивирования и других технологических фазах. Следует отметить, что при характеристике подлинности и активности клеток, полученных из ИПСК, основная проблема заключается в недостаточном уровне их созревания;

- необходимо привести обоснования использования результатов внутрипроизводственного контроля для выпуска серии ЛП;
- необходимо представить описание влияния биологически активных молекул (факторы роста, цитокины) на остальные компоненты АФС;
- для препаратов с трехмерными структурами необходима оценка состояния дифференцировки, структурной и функциональной организации клеток в результате комбинирования с матриксами, скаффолдами, медицинскими изделиями, а также образующегося внеклеточного матрикса;
- при описании разработки ЛП необходимо представить анализ целостности популяции клеток после технологических манипуляций в готовом ЛП.

Таким образом, программа контроля качества готового соматотерапевтического или тканеинженерного ЛП, полученного из ИПСК, должна основываться на принципе прослеживаемости характеристик качества начиная с исходного материала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные подходы мировых регуляторных органов, международных организаций, в том числе Европейского банка ИПСК (EBiSC) и отдельных медицинских центров, специализирующихся на производстве препаратов генной и клеточной терапии, основаны на принципе строгой прослеживаемости качества лекарственных препаратов на основе ИПСК начиная с исходного материала ввиду особенностей их производства. Процедура получения ИПСК рассматривается как полноценный

технологический процесс, соответствующий правилам надлежащей производственной практики (GMP) для генетически модифицированных клеток.

Контроль качества ИПСК предусматривает определение специфических показателей, включая следующие: остаточное содержание ДНК-векторов, использованных для перепрограммирования (оценка чистоты); экспрессия маркеров недифференцированного состояния клеток (подтверждение подлинности); тест на плюрипотентность (оценка активности). Однако в настоящее время в нормативных документах в недостаточной степени описано регулирование процедур квалификации и валидации этих методик, включая критерии приемлемости, для их использования в условиях производства, соответствующего требованиям GMP.

Перечень критических показателей качества ИПСК клинического назначения, предложенный

Глобальным альянсом по терапии ИПСК (GAIТ), в целом соответствует регуляторным нормам стран ЕАЭС и с учетом представленных авторами в обзоре нормативных, методических документов и научных рекомендаций может служить основой при составлении программ контроля качества лекарственных препаратов на основе ИПСК для последующего использования на территории Российской Федерации и ЕАЭС.

Программа контроля качества готовых соматотерапевтических или тканеинженерных препаратов ЛП, полученных из ИПСК, должна соответствовать типу дифференцированных клеток и учитывать показания к клиническому применению. Критическими аспектами качества при характеристике ИПСК являются доказательство отсутствия примесных недифференцированных клеток и клеток с новыми иммуногенными эпитопами, а также подтверждение подлинности и генетической стабильности.

Литература/References

- Sullivan S, Stacey GN, Akazawa Ch, Aoyama N, Baptista R, Bedford P, et al. Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regen Med*. 2018; 13(7):859–66. <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0095>
- Yoshida S, Kato TM, Sato Y, Umekage M, Ichisaka T, Tsukahara M, et al. A clinical-grade HLA haplobank of human induced pluripotent stem cells matching approximately 40% of the Japanese population. *Med*. 2023;4(1):51–66.e10. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2022.10.003>
- Tian P, Elefanty A, Stanley EG, Durnall JC, Thompson LH, Elwood NJ. Creation of GMP-compliant iPSCs from banked umbilical cord blood. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:835321. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.835321>
- Novoa JJ, Westra IM, Steeneveld E, Neves NF, Arendzen CH, Rajaei B, et al. Good Manufacturing Practice-compliant human induced pluripotent stem cells: From bench to putative clinical products. *Cytotherapy*. 2024;26(6):556–66. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2024.02.021>
- Novoa J, Westra I, Steeneveld E, Neves NF, Daleman L, Asensio AB, et al. Validating human induced pluripotent stem cell-specific quality control tests for the release of an intermediate drug product in a Good Manufacturing Practice quality system. *Cytotherapy*. 2024;26(9):1105–17. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2024.04.004>
- O'Shea O, Steeg R, Chapman C, Mackintosh P, Stacey GN. Development and implementation of large-scale quality control for the European Bank for Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Res*. 2020;45:101773. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101773>
- Steeg R, Mueller SC, Mah N, Holst B, Cabrera-Socorro A, Stacey GN, et al. EBiSC best practice: How to ensure optimal generation, qualification, and distribution of iPSC lines. *Stem Cell Reports*. 2021;16(8):1853–67. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.07.009>
- Shi J-X, Zhang K-Z. Advancements in autologous stem cell transplantation for Parkinson's disease. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2024;19(10):1321–7. <https://doi.org/10.2174/1574888x19666230907112413>
- Cerneckis J, Cai H, Shi Y. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): Molecular mechanisms of induction and applications. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):112. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01809-0>
- Schweitzer JS, Song B, Herrington TM, Park T-Y, Lee N, Ko S, et al. Personalized iPSC-derived dopamine progenitor cells for Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2020;382(20):1926–32. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1915872>
- Choompoo N, Bartley OJM, Precious SV, Vinh N-N, Schnell Ch, Garcia A, et al. Induced pluripotent stem cells derived from the developing striatum as a potential donor source for cell replacement therapy for Huntington dis-
- ease. *Cytotherapy*. 2021;23(2):111–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.06.001>
- Huang K, Hu S, Cheng K. A new era of cardiac cell therapy: Opportunities and challenges. *Adv Healthc Mater*. 2019; 8(2):e1801011. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801011>
- Finck AV, Blanchard T, Roselle CP, Golinelli G, June CH. Engineered cellular immunotherapies in cancer and beyond. *Nat Med*. 2022;28:678–89. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01765-8>
- Cuesta-Gomez N, Verhoeff K, Jasra IT, Pawlick R, Dadheech N, Shapiro AMJ, et al. Characterization of stem-cell-derived islets during differentiation and after implantation. *Cell Rep*. 2022;40(8):111238. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111238>
- Ramzy A, Thompson DM, Ward-Hartstonge KA, Ivison S, Cook L, Garcia RV, et al. Implanted pluripotent stem-cell-derived pancreatic endoderm cells secrete glucose-responsive C-peptide in patients with type 1 diabetes. *Cell Stem Cell*. 2021;28(12):2047–61. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.10.003>
- Kelly K, Bloor AJC, Griffin JE, Radia R, Yeung DT, Rasko JEJ, et al. Two-year safety outcomes of iPSC cell-derived mesenchymal stromal cells in acute steroid-resistant graft-versus-host disease. *Nat Med*. 2024;30(6):1556–8. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-02990-z>
- Kim JY, Nam Y, Rim YA, Ju JH. Review of the current trends in clinical trials involving induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2022;18(1):142–54. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10262-3>
- Мельникова ЕВ, Меркулов ВА, Меркулова ОВ. Регуляторные механизмы внедрения генной и клеточной терапии в медицинскую практику в странах Восточной Азии. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторное исследование и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(1):29–41. Melnikova EV, Merkulov VA, Merkulova OV. Regulation for the translation of gene and cell therapy into medical practice in East Asian Countries. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(1):29–41 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-1-29-41>
- Zhang Y, Wei J, Cao J, Zhang K, Peng Y, Deng H, et al. Requirements for human-induced pluripotent stem cells. *Cell Prolif*. 2022;55(4):e13182. <https://doi.org/10.1111/cpr.13182>
- Sullivan S, Ginty P, McMahon S, May M, Solomon SL, Kurtz A, et al. The Global Alliance for iPSC Therapies (GAIТ). *Stem Cell Res*. 2020;49:102036. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102036>
- Wei W, Gaffney DJ, Chinnery PF. Cell reprogramming shapes the mitochondrial DNA landscape. *Nat Commun*. 2021;

- 12(1):5241. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25482-x>
22. Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy – promise and challenges. *Cell Stem Cell*. 2020;27(4):523–31. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014>
 23. Wu J, Li T, Guo M, Ji J, Meng X, Fu T, et al. Treating a type 2 diabetic patient with impaired pancreatic islet function by personalized endoderm stem cell-derived islet tissue. *Cell Discov*. 2024;10(1):45. <https://doi.org/10.1038/s41421-024-00662-3>
 24. Maruyama Y. Regulatory update of regenerative medicine in Japan. *7th India-Japan Medical Products Regulatory Symposium*. New Delhi, India; 2024.
 25. Хорольский МД, Семенова ИС, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ. Применение метода коротких tandemных повторов для аутентификации клеточных линий. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):251–60. Khorolsky MD, Semenova IS, Melnikova EV, Olefir YuV. The use of short tandem repeat analysis for cell line authentication. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):251–60 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-251-260>
 26. Мельникова ЕВ, Рачинская ОА, Трусов ГА, Хорольский МД, Семенова ИС, Терешкина НВ и др. Обоснование методических подходов к экспертной оценке подлинности биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(1):28–38. Melnikova EV, Rachinskaya OA, Trusov GA, Khorolsky MD, Semenova IS, Tereshkina NV, et al. Justification of methodological approaches to identification testing of biomedical cell products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):28–38 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-28-38>
 27. Покровский НС, Водякова МА, Меркулов ВА, Мельникова ЕВ. Особенности и ключевые параметры валидации методик фенотипирования клеточных линий. *Иммунология*. 2024;45(3):343–54. Pokrovsky NS, Vodyakova MA, Merkulov VA, Melnikova EV. Specific aspects and key parameters of validation for methods of phenotyping of cell lines included in cell therapy products. *Immunologiya*. 2024;45(3):343–54 (In Russ.). <https://doi.org/10.33029/1816-2134-2024-45-3-343-354>
 28. Покровский НС, Водякова МА, Меркулов ВА, Мельникова ЕВ. Рекомендации по созданию алгоритма валидации методик фенотипирования клеточных ли-
 - ний. *Иммунология*. 2024;45(4):505–17. Pokrovsky NS, Vodyakova MA, Merkulov VA, Melnikova EV. Recommendations for creating a validation algorithm of cell lines phenotyping methods. *Immunologiya*. 2024;45(4):505–17 (In Russ.). <https://doi.org/10.33029/1816-2134-2024-45-4-505-517>
 29. Чапленко АА, Меркулова ОВ, Семенова ИС, Сайфутдинова АР, Мельникова ЕВ, Меркулов ВА. Детекция микоплазм в эукариотических клеточных линиях методом real-time ПЦР с использованием различных способов концентрирования образца. *Цитология*. 2020;62(1):56–63. Chaplenko AA, Merkulova OV, Semenova IS, Saifutdinova AR, Melnikova EV, Merkulov VA. Detection of mycoplasmas in eukaryotic cell lines by real-time PCR using various methods of sample concentration. *Tsitologiya*. 2020;62(1):56–63 (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0041377120010034>
 30. Richards S, Aziz N, Bale Sh, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405–24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
 31. Beckenkamp LR, da Silva CG, Hohendorff MLI, Ogliari KS. Manufacturing parameters for the creation of clinical-grade human-induced pluripotent stem cell lines from umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Transl Med*. 2024;13(5):454–61. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szae010>
 32. Poetsch MS, Strano A, Guan K. Human induced pluripotent stem cells: From cell origin, genomic stability, and epigenetic memory to translational medicine. *Stem Cells*. 2022;40(6):546–55. <https://doi.org/10.1093/stmcls/sxac020>
 33. Scesa G, Adami R, Bottai D. iPSC preparation and epigenetic memory: Does the tissue origin matter? *Cells*. 2021;10(6):1470. <https://doi.org/10.3390/cells10061470>
 34. Hargus G, Ehrlich M, Hallmann AL, Kuhlmann T. Human stem cell models of neurodegeneration: A novel approach to study mechanisms of disease development. *Acta Neuropathol*. 2014;127(2):151–73. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1222-6>
 35. Chlebanowska P, Sulkowski M, Skrzypek K, Tejchman A, Muszyńska A, Noroozi R, et al. Origin of the induced pluripotent stem cells affects their differentiation into dopaminergic neurons. *Int J Mol Sci*. 2020;21(16):5705. <https://doi.org/10.3390/ijms21165705>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены *таблицы S1 и S2, рисунок S1*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-127-140-table-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-127-140-table-s2>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-127-140-fig-s1>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Мельникова** – концепция работы, написание текста рукописи, формулировка выводов; **О.А. Рачинская, И.С. Семенова** – работа с источниками литературы; **В.А. Меркулов** – участие в формулировке выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Additional information. *Tables S1 and S2 and Figure S1* are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-127-140-table-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-127-140-table-s2>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-127-140-fig-s1>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Melnikova** conceptualised the study, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **O.A. Rachinskaya** and **I.S. Semenova** worked with literature sources. **V.A. Merkulov** participated in formulating the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук / **Ekaterina V. Melnikova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

Рачинская Ольга Анатольевна, канд. биол. наук / **Olga A. Rachinskaya**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8377-9205>

Семенова Ирина Семеновна, канд. биол. наук / **Irina S. Semenova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9026-0508>

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

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

Поступила 24.03.2025

После доработки 29.04.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Received 24 March 2025

Revised 29 April 2025

Accepted 6 June 2025



Реализация концепции Quality by Design для генотерапевтического лекарственного препарата на основе аденоассоциированного вирусного вектора

Д.С. Копеин✉, Г.Н. Порошин, Р.А. Хамитов

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

✉ Копеин Дамир Сергеевич; kopein@generium.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Производители генотерапевтических лекарственных препаратов на основе аденоассоциированных вирусов (ААВ) сталкиваются в настоящее время с рядом системных проблем, в основе которых лежат трудности в оценке качества препаратов из-за недостаточной базы научных данных, опыта и несовершенства нормативных и регуляторных требований. Риск-ориентированный подход для оценки критических показателей качества в рамках концепции «качество через дизайн» (Quality by Design, QbD) обеспечивает повышение эффективности разработки и производства высокотехнологичных лекарственных препаратов.

ЦЕЛЬ. Определение критических показателей качества и их диапазонов при разработке генотерапевтических лекарственных препаратов на основе ААВ для лечения миодистрофии Дюшенна в рамках реализации концепции «качество через дизайн» (QbD).

ОБСУЖДЕНИЕ. Проведен анализ подходов к разработке технологии производства ААВ с использованием концепции QbD. Обоснован перечень основных характеристик ААВ и доступных данных об их влиянии на пациентов с точки зрения эффективности и безопасности, в том числе иммунного ответа на лечение. Проведена оценка рисков и определен перечень критических показателей качества ААВ. В ходе разработки процесса производства ААВ определены диапазоны значений для показателей качества ААВ вектора: вирусный и инфекционный титры, наличие репликативно-компетентных ААВ, содержание пустых капсидов и остаточных примесей (белки, плазмидная ДНК и остаточная ДНК продуцента). Проведена комплексная оценка рисков при определении целевого профиля продукта – препарата на основе ААВ для лечения миодистрофии Дюшенна. Разработан перечень критических показателей качества препарата и основные требования к аналитическим методикам, а также установлены диапазоны значений параметров для контроля качества продукта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Применение концепции QbD и риск-ориентированного подхода является важным этапом в идентификации критических показателей качества при разработке генотерапевтических лекарственных препаратов. Использование методологии QbD позволяет сформировать новые регуляторные стандарты оценки безопасности и эффективности генотерапевтических препаратов, а также осуществлять их фармацевтическую разработку и промышленное производство.

Ключевые слова: генная терапия; генотерапевтический лекарственный препарат; аденоассоциированный вирус; ААВ; аденоассоциированный вирусный вектор; Quality by Design; критические показатели качества; целевой профиль качества препарата; риск-ориентированный подход; технология получения ААВ; миодистрофия Дюшенна

Для цитирования: Копеин Д.С., Порошин Г.Н., Хамитов Р.А. Реализация концепции Quality by Design для генотерапевтического лекарственного препарата на основе аденоассоциированного вирусного вектора. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(2):141–155. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-580>

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Р.А. Хамитов является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2013 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Implementation of the quality-by-design concept for an adeno-associated viral vector-based gene therapy

Damir S. Kopein ✉, Grigory N. Poroshin, Ravil A. Khamitov

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

✉ Damir S. Kopein; kopein@generium.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Currently, manufacturers of adeno-associated virus (AAV)-based gene therapy products are facing a number of systemic problems stemming from the difficulties in assessing the quality of medicinal products due to insufficient scientific data, limited experience, and imperfect regulatory requirements. However, a risk-based approach to assessing critical quality attributes (CQAs) within the the framework of Quality by Design (QbD) can ensure improved efficiency in the development and production of advanced therapy medicinal products.

AIM. This study aimed to identify QbD-based CQAs and associated specifications for the development of AAV-based gene therapy products for Duchenne muscular dystrophy.

DISCUSSION. This study involved an analysis of QbD-based approaches to the development of AAV production technologies. The authors substantiated a list of the main AAV characteristics and collated available data on their impact on patients in terms of the efficacy and safety of gene therapy products and, in particular, the immune response to treatment. Following a risk assessment, the authors identified a list of CQAs for AAVs. When developing an AAV production process, the authors determined specifications for AAV CQAs, including viral and infectious titres, the presence of replication-competent AAVs, the percentage of empty capsids, and residual impurities (proteins, plasmid DNA, and residual host-cell DNA). A comprehensive risk assessment was conducted to determine the quality target product profile for an AAV-based gene therapy product for Duchenne muscular dystrophy. The authors listed the CQAs, developed the basic requirements for the applicable analytical procedures, and established the CQA specifications for the gene therapy product.

CONCLUSIONS. The use of QbD principles and risk-based approaches is an important step in CQA identification during the development of gene therapy products. The QbD methodology facilitates drafting new regulatory standards for the evaluation of the safety and efficacy of gene therapy products and helps with the development and commercial-scale manufacturing of such products.

Keywords:

gene therapy; advanced therapy medicinal product; ATMP; adeno-associated virus; AAV; adeno-associated viral vector; Quality by Design; QbD; critical quality attribute; CQA; quality target product profile; QTPP; risk-based approach; AAV production technology; Duchenne muscular dystrophy; DMD

For citation:

Kopein D.S., Poroshin G.N., Khamitov R.A. Implementation of the quality-by-design concept for an adeno-associated viral vector-based gene therapy. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(2):141–155. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-580>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. R.A. Khamitov has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2013. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Генотерапевтические лекарственные препараты (ГенЛП) – инновационный класс терапевтических средств, принцип действия которых основан на доставке нового генетического материала в клетки-мишени, что открывает широкие возможности для терапии заболеваний, относящихся к неизлечимым или трудно поддающимся лечению, а также для повышения эффективности уже имеющихся терапевтических подходов за счет комбинированной стратегии. Особой группой ГенЛП являются препараты, созданные с использованием векторов на основе аденоассоциированных вирусов (ААВ). За последние годы произошло стремительное развитие в области использования ААВ в генной терапии, что продемонстрировало их значительный потенциал для лечения широкого спектра генетических заболеваний [1]. В настоящее время проводится более 250 клинических исследований с использованием ААВ в качестве терапевтического агента [2]. Эффект ААВ обусловлен действием в отношении мутаций генов, вызывающих либо отсутствие, либо дефицит функционального варианта белка. Генная терапия на основе ААВ может обеспечить подавление работоспособности гена с мутацией или коррекцию дефектного гена до функциональной копии в виде нативной либо синтетической нуклеотидной последовательности.

Разработка любых инновационных препаратов, в том числе и на основе ААВ, сталкивается с рядом научных и производственных проблем. В связи с этим актуальным представляется применение концепции «качество через дизайн» (Quality by Design, QbD)¹ – системного современного подхода к разработке лекарственных препаратов. Концепция QbD основывается на постановке цели, поэтапном анализе, оценке всех стадий получения препарата, разработке стратегии контроля, валидации, а также определении всех рисков, связанных с качеством.

Авторами данной статьи рассматривается реализация подхода QbD при создании ГенЛП на основе ААВ, предназначенного для лечения миодистрофии Дюшенна, производства АО «ГЕНЕРИУМ». В основе технологии получения ААВ лежит транзientная трансфекция клеток линии HEK293. Основным этапом для реализации концепции при разработке продукта – определение биологических, физико-химических и других характеристик, для которых должны контролироваться диапазоны значений показателей для обеспечения желаемого качества

продукта. Только на основе понимания критичности показателей качества продукта можно выстроить стратегию контроля на всех этапах производства и получить продукт наиболее рациональным путем.

Цель работы – определение критических показателей качества и их диапазонов при разработке ГенЛП на основе ААВ для лечения миодистрофии Дюшенна в рамках реализации концепции QbD.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ААВ векторы как платформа для создания генотерапевтических препаратов

Первый препарат на основе ААВ Глибера (алипоген типарвовек) был одобрен в 2012 г. для терапии дефицита липопротеинлипазы. С 2017 по 2024 гг. было зарегистрировано еще несколько ГенЛП на основе ААВ, в том числе Элевидис (деландистроген моксепарвовек), предназначенный для лечения мышечной дистрофии Дюшенна [3].

ААВ представляет собой безоболочечный вирус рода *Dependovirus* семейства *Parvoviridae*, размер капсида которого составляет 20–25 нм, с геномом в виде одноцепочечной ДНК (около 4,7 тыс. п.о.). Для эффективной трансдукции клеток человека ААВ требуется коинфекция такими вспомогательными вирусами, как аденовирус или вирус простого герпеса человека [4]. Геном дикого типа вируса состоит из генов *rep* и *cap*, фланкированных двумя инвертированными терминальными повторами (inverted terminal repeats, ITR) по 145 п.о. Последовательности ITR участвуют в упаковке вирусного генома (vg), инициируют старт репликации и могут действовать как элементы интеграции в конкретную последовательность на хромосоме 19 человека (локус AAVS1) [5, 6]. Ген *rep* кодирует четыре белка (Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40), участвующих в репликации и упаковке вирусного генома. Ген *cap* кодирует три вирусных капсидных белка (VP1, VP2, VP3). Существует несколько основных серотипов ААВ (с ААВ1 по ААВ9), характеризующихся различной тканеспецифичностью [7].

Вирус дикого типа в качестве основы для создания системы доставки терапевтической нуклеотидной последовательности обладает рядом преимуществ, таких как отсутствие патогенности для человека, способность трансдуцировать делящиеся и неделящиеся клетки, а также возможность сохраняться продолжительное время в клетке в виде стабильной эписомы

¹ [ICH guideline Q8 \(R2\) on pharmaceutical development](#). EMA; 2017.

[ICH Q9 \(R1\) Quality risk management](#). ICH; 2023.

[ICH Q10 Pharmaceutical quality system](#). ICH; 2008.

без интеграции в геном трансдуцированной клетки. Современные методы генной инженерии и биотехнологии позволяют получать более совершенные варианты ААВ. Так, с использованием подхода рационального дизайна были созданы новые ААВ, в гены белков оболочки капсида которых вносили мутации для увеличения тканевой специфичности или модификации антигенных участков. Варианты ААВ с улучшенными свойствами доставки гена были получены с применением методов направленной эволюции [8].

Для создания рекомбинантного ААВ гены *rep* и *cap* в геноме вируса заменяют на нуклеотидную последовательность терапевтического гена, которую требуется доставить в клетку, а гены *rep* и *cap* переносят во вспомогательный плазмидный вектор или вирус. Вследствие этого, в геноме ААВ нативным генетическим элементом вируса дикого типа остается нуклеотидная последовательность ITR. Эти изменения приводят к неспособности вектора к самостоятельной репликации и интеграции в геном человека, а также повышают уровень проникновения в клетки тканей различных типов в зависимости от серотипа вируса. Созданные векторы на основе ААВ характеризуются длительной и стабильной экспрессией генов, а также низким уровнем иммунного ответа на введение ААВ [9]. Однако кроме описанных выше преимуществ векторов на основе ААВ также следует упомянуть о некоторых недостатках, к которым относят ограничения объема доставляемой в клетку генетической информации, наличие в человеческой популяции предсуществующих, в том числе нейтрализующих, антител к белкам капсида или белку целевого трансгена.

Международный опыт в разработке ААВ векторов с использованием подхода QbD

Концепция QbD была впервые предложена экспертом по качеству Д.М. Джураном [10] и начиная с 1990-х гг. широко используется в фармацевтической промышленности, в том числе при разработке и производстве рекомбинантных белков. Подход QbD является комплексным и включает в себя определение целевого профиля качества продукта (quality target product profile, QTPP), определение критических показателей качества (critical quality attributes, CQA), разработку процесса производства и стратегии контроля.

Согласно рекомендациям Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)² ключевым в подходе QbD является этап определения QTPP и CQA. Целевой профиль качества продукта основывается на данных о механизме действия разрабатываемого препарата, желаемой эффективности и безопасности, а также способе введения и дозе лекарственного препарата. Исходя из QTPP выделяют все показатели, которые могут влиять на безопасность и эффективность препарата. Далее на основе оценки риска для каждого показателя определяют CQA. Рекомендации ICH³ и Альянса регенеративной медицины (Alliance for Regenerative Medicine, ARM)⁴ описывают общий план управления рисками. Ранжирование рисков осуществляется следующим образом: каждый показатель качества оценивается исходя из уровня его потенциального воздействия (severity, impact) и степени неопределенности (uncertainty). При этом высокий уровень потенциального воздействия определяется для показателей качества, изменение которых может вызвать значительное изменение профиля безопасности/эффективности препарата. Что касается степени неопределенности, то низкий уровень устанавливается в случае хорошо охарактеризованного клинического эффекта, основанного на обширных данных *in vitro*, *in vivo* и клинических исследований, а высокий – для тех показателей, информация о влиянии которых на клинический эффект отсутствует либо недостаточна. Умножая уровень потенциального воздействия на степень неопределенности, можно установить уровень риска и тем самым классифицировать показатели: критические (CQA), потенциально критические или некритические (табл. 1, опубликована на сайте журнала⁵).

С целью контроля рисков и классификации показателей качества необходимо определить целевой профиль качества продукта – рекомбинантного ААВ. Было разработано несколько систем экспрессии для производства рекомбинантного ААВ, пригодного для использования в клинических исследованиях [9]. В зависимости от метода доставки вспомогательных элементов *rep*, *cap* и/или регуляторных элементов

² [ICH guideline Q8 \(R2\) on pharmaceutical development](#). EMA; 2017.

³ [ICH Q9 \(R1\) Quality risk management](#). ICH; 2023.

⁴ Project A-Gene. A case study-based approach to integrating QbD principles in gene therapy CMC programs. Alliance for Regenerative Medicine; 2021. <https://alliancerm.org/manufacturing/a-gene-2021/>

⁵ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-580-table1>

в клетку-продуцент способы производства ААВ можно разделить на четыре основных типа: 1) трансфекция клеток млекопитающих плазмидной ДНК; 2) получение стабильной клеточной линии млекопитающих с генами вспомогательных элементов; 3) заражение клеток млекопитающих рекомбинантными вирусами, сконструированными на основе вируса простого герпеса; 4) заражение клеток насекомых рекомбинантным бакуловирусом. Из перечисленных наиболее распространенным вариантом является первый способ производства на основе котрансфекции клеточной линии-продуцента (HEK293) тремя плазмидами, каждая из которых содержит нуклеотидную последовательность соответствующих вспомогательных элементов: плазида с генами *rep*, *cap*; плазида с вспомогательными вирусными генами аденовируса 5 серотипа; плазида с терапевтическим геном и ITR. Затем трансфицированные клетки культивируют для формирования ААВ. Для извлечения вирусных частиц из клеток после культивирования используются такие варианты лизиса клеток, как осмотический шок, проведение нескольких циклов замораживания–оттаивания клеток или обработка клеток мягкими детергентами. Из полученных лизатов клеточный дебрис

удаляется центрифугированием или фильтрацией. ДНК клеток HEK293 расщепляется нуклеазой для снижения вязкости клеточного лизата. Последующая очистка ААВ проводится с помощью ультрацентрифугирования и хроматографии. Ультрацентрифугирование позволяет отделить ААВ от прочих компонентов, а также фракционировать пустые и полные капсиды. Хроматография обеспечивает выделение ААВ по свойствам поверхности или размеру капсида и может представлять собой комбинацию аффинной, ионообменной и эксклюзионной хроматографии. Концентрирование и перевод в буфер готовой формы для хранения ААВ осуществляется с помощью ультрафильтрации. На последнем этапе препарат ААВ стерилизуют фильтрацией и разливают во флаконы. Общая схема производства представлена на рисунке 1.

Показатели качества ААВ (табл. 2) можно разделить на следующие основные категории:

- показатели качества целевого продукта – количественное содержание, подлинность, состав готового препарата ААВ;
- показатели качества, учитывающие наличие примесей, как связанных с ААВ, так и связанных с процессом производства;

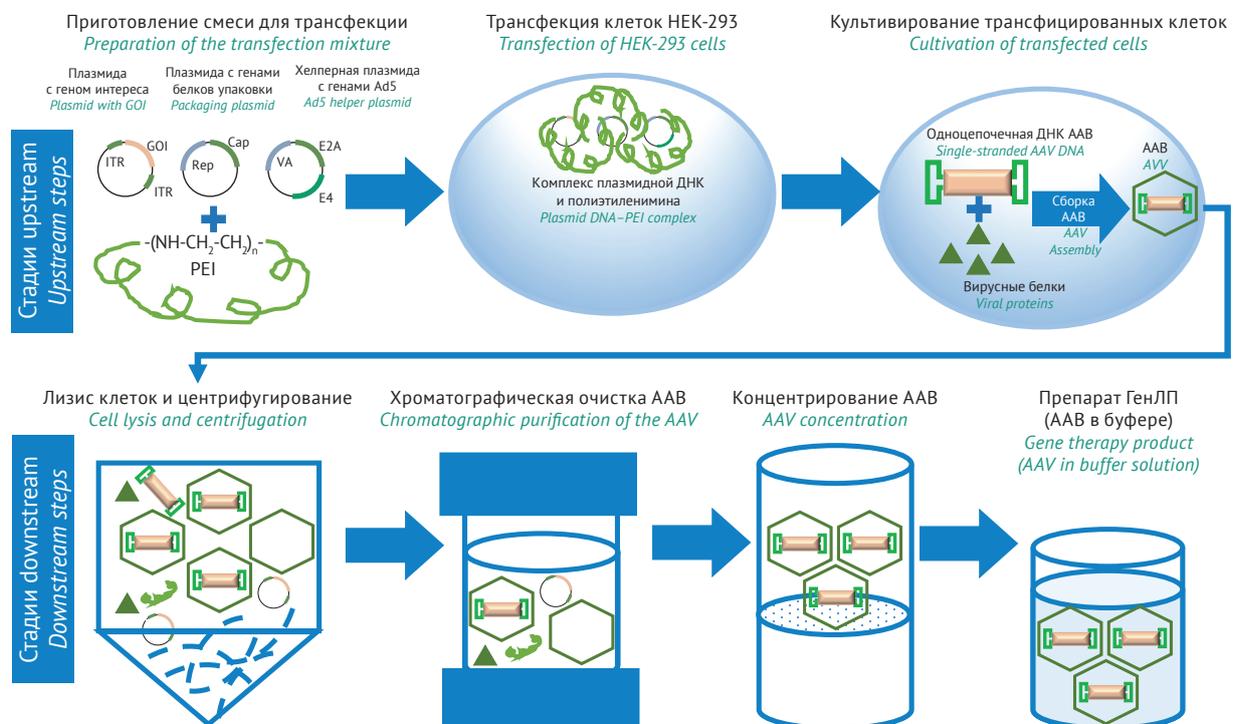


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Типовая схема производства рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (ААВ). ГенЛП – генотерапевтический лекарственный препарат; Ad5 – аденовирус 5 серотипа; PEI – полиэтиленимин.

Fig. 1. Typical production scheme for adeno-associated viruses (AAVs). Ad5, adenovirus type 5; PEI, polyethylenimine; GOI, gene of interest.

Таблица 2. Показатели качества при производстве рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (ААВ)
Table 2. Quality attributes in a typical AAV production process

Показатель качества <i>Quality attribute</i>	Уровень риска (уровень потенциального воздействия × степень неопределенности) <i>Risk level (potential impact × uncertainty)</i>	Критичность показателя <i>Attribute criticality</i>
Микробиологическая и вирусная безопасность <i>Microbiological and viral safety</i>		
Стерильность, эндотоксины, посторонние вирусы (вирусная безопасность), микоплазма <i>Sterility, bacterial endotoxins, adventitious viral agents (viral safety), mycoplasma</i>	10 (10×1)	CQA
Репликативно-компетентные ААВ <i>Replication-competent AAVs</i>	9 (3×3)	CQA
Подлинность <i>Identity</i>		
Наличие вирусных частиц / белков капсида, средний размер вирусных частиц <i>Presence of viral particles / capsid proteins, average size of viral particles</i>	10 (10×1)	CQA
Последовательность терапевтического гена <i>Sequence of the gene of interest</i>	10 (10×1)	CQA
Целостность вирусного генома <i>Viral genome integrity</i>	10 (10×1)	CQA
Показатели готовой лекарственной формы <i>Finished dosage form parameters</i>		
Внешний вид, pH, осмоляльность <i>Appearance, pH, osmolality</i>	10 (10×1)	CQA
Содержание и активность ААВ <i>AAV content and strength</i>		
Биологическая (специфическая) активность <i>Biological activity (potency)</i>	30 (10×3)	CQA
Инфекционный титр <i>Infectious titre</i>	20 (10×2)	CQA
Общая концентрация капсидов <i>Capsid titre</i>	10 (10×1)	CQA
Геномный титр <i>Vector genome titre</i>	30 (10×3)	CQA
Чистота ААВ / Примеси <i>AAV purity / Impurities</i>		
Остаточные белки клеток-продуцентов <i>Residual host-cell proteins</i>	1 (1×1)	н/к <i>n/c</i>
Остаточная ДНК клеток-продуцентов <i>Residual host-cell DNA</i>	3 (3×1)	п/к <i>p/c</i>
Остаточная плазмидная ДНК <i>Residual plasmid DNA</i>	3 (3×1)	п/к <i>p/c</i>
Остаточный трансфекционный агент <i>Residual transfection reagent</i>	3 (3×1)	п/к <i>p/c</i>
Остаточные компоненты хроматографических сорбентов <i>Residual components of chromatographic sorbents</i>	3 (3×1)	п/к <i>p/c</i>
Остаточная эндонуклеаза <i>Residual endonuclease</i>	3 (3×1)	п/к <i>p/c</i>
Остаточные компоненты питательной среды (антибиотики, бычий сывороточный альбумин, индукторы и др.) <i>Residual cell culture medium components (antibiotics, bovine serum albumin, inductors, etc)</i>	1 (1×1)	н/к <i>n/c</i>

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

Показатель качества <i>Quality attribute</i>	Уровень риска (уровень потенциального воздействия × степень неопределенности) <i>Risk level (potential impact × uncertainty)</i>	Критичность показателя <i>Attribute criticality</i>
Остаточные компоненты для создания градиента плотности <i>Residual density gradient materials</i>	3 (3×1)	п/к <i>p/c</i>
Чистота белков капсида <i>Capsid protein purity</i>	3 (3×1)	п/к <i>p/c</i>
Пустые капсиды <i>Empty capsids</i>	20 (10×2)	CQA

Таблица составлена авторами по материалам Альянса регенеративной медицины⁶, с изменениями / The table is adapted by the authors from materials of the Alliance for Regenerative Medicine⁶

Примечание. CQA – критический показатель качества; п/к – потенциально критический показатель качества; н/к – некритический показатель качества.

Note. CQA, critical quality attribute; p/c, potentially critical quality attribute; n/c, non-critical quality attribute.

– биологические контаминанты (инфекционные агенты, в том числе репликативно-компетентные ААВ), влияющие на безопасность или стабильность лекарственного препарата.

Оценка риска для показателей качества ААВ вектора

Каждому показателю качества присваивается уровень потенциального воздействия и степень неопределенности, по совокупности которых определяется уровень риска. В *таблице 2* представлена оценка риска по основным показателям качества для ААВ.

Биологическая (специфическая) активность и титр вируса (инфекционный, геномный титры) – это первая по важности группа параметров, от которых напрямую зависит точность дозирования и, как следствие, эффективность и безопасность применения препарата.

Биологическая активность. Оценка биологической активности продуктов экспрессии гена интереса ААВ проводится по функциональной активности белка и количественной оценке содержания РНК. Например, для ААВ, несущих ген фермента, количественная оценка биологической активности может быть определена по ферментативной реакции белка *in vitro*. Однако для генов, продукты экспрессии которых не обладают выраженной функциональной активностью (например, ген структурного белка), определение биологической активности препарата может быть проведено методом иммуноферментного анализа (ИФА), проточной цитометрии или ПЦР на наличие РНК. В таких случаях необходимо установить соотношение между уровнем специфической активности, измеренной опосредованно, и титром вируса.

Титр ААВ вектора. Показатель титра или концентрацию вируса можно разделить на три составляющих: общая концентрация капсидов, геномный титр и инфекционный титр.

Под общей концентрацией капсида подразумевается содержание всех капсидов, независимо от наличия или отсутствия содержащегося в них генома или их способности трансдуцировать клетки. Общую концентрацию капсидов можно надежно определять с помощью простых методов, таких как ИФА (с антителами, специфичными к белкам капсида) или спектрофотометрически. Этот показатель, как правило, измеряют только при разработке и оптимизации процесса производства и обычно не включают в список показателей для контроля продукта на финальных стадиях производства.

Под инфекционным титром понимают количество функционально активных вирусов, которые способны к трансдукции. Инфекционный титр оценивают биологическим методом путем подсчета количества зараженных вирусом клеток. Поскольку инфицирование клеток ААВ не сопровождается цитопатическим эффектом, то классический метод прямого подсчета бляшек неприменим. В связи с этим для определения этого показателя необходимы либо котрансдукция хелперным вирусом, либо использование специальных клеточных линий. Однако такой метод не позволяет с достаточной точностью и воспроизводимостью количественно определять содержание вирусных частиц, способных к трансдукции целевых клеток [11]. Из-за низкой точности метода количество ААВ обычно устанавливают по геномному титру [12].

Геномный титр или концентрация вирусных геномов – это количество капсидов

⁶ Project A-Gene. A case study-based approach to integrating QbD principles in gene therapy CMC programs. Alliance for Regenerative Medicine; 2021. <https://alliancerm.org/manufacturing/a-gene-2021/>

с инкапсулированным вирусным геномом, определяемое методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) или цифровой ПЦР (цПЦР). В настоящее время метод ПЦР-РВ является стандартом в области ААВ, что обусловлено его простотой, специфичностью и надежностью. Однако более оптимален метод цПЦР, который позволяет определять абсолютную концентрацию вирусных геномов и для которого не требуется применение стандартного образца в отличие от метода ПЦР-РВ [13, 14]. Следует отметить, что при использовании ПЦР как основного метода подсчета вирусного титра необходимо соотнести количество вирусных геномов с функциональной активностью вируса с помощью еще как минимум одного метода.

Наличие в препарате ААВ пустых капсидов (без терапевтического гена) или частично заполненных капсидов, не обладающих специфической активностью, повышает вероятность развития или увеличения иммунного ответа пациентов на терапию. Кроме того, такие капсиды конкурируют с функционально активными полными капсидами за связывание с рецепторами целевых клеток и тем самым снижают вероятность трансдукции, что в итоге оказывает негативное влияние на эффективность препарата. Поэтому количество пустых или частично заполненных капсидов является вторым по важности показателем качества при разработке процесса производства. Согласно данным литературы встречаются разные значения показателя в образцах ААВ: от 1% до более 90% [15, 16]. В клинических исследованиях показано, что при введении препарата ААВ с 84% пустых капсидов наблюдались Т-клеточные реакции, специфичные для капсида [17]. Известно, что для препарата Золгенсма значение этого показателя установлено как «не более 7%» [18].

Специфические антитела к ААВ являются не только одной из возможных причин снижения эффективности, но могут приводить к развитию тяжелых побочных реакций [19]. Основными мишенями иммунного ответа организма-хозяина против ААВ являются капсид и/или терапевтический белок. Из-за высокой встречаемости ААВ дикого типа в человеческой популяции в течение первых двух лет жизни часто развивается иммунный ответ практически против всех серотипов вируса. Большинство иммунных побочных реакций связано с активацией Т-клеточного звена иммунитета и в первую очередь проявляется в отношении гепатоцитов, трансдуцированных ААВ [20]. Метаанализ, проведенный на основе

данных 255 клинических исследований, показал, что из 30 приостановленных в 2021–2022 гг. исследований причиной остановки 18 было выраженное токсическое действие препаратов, преимущественно гепатотоксичность [2].

Узкое терапевтическое окно препаратов на основе ААВ обусловлено близкими значениями диапазонов эффективных и токсических доз. Клиническое исследование ASPIRO (NCT03199469) препарата резамириген билпарвовек (AT132) в отношении X-сцепленной миотубулярной миопатии было приостановлено из-за гибели 4 из 17 пациентов, получивших самую высокую дозу ААВ8 ($3,5 \times 10^{14}$ вг/кг). При лечении спинальной мышечной атрофии препаратом Золгенсма зарегистрированы случаи гибели пациентов, в том числе в России и Казахстане⁷. В то же время снижение дозы ААВ приводит к недостаточной терапевтической эффективности из-за эффекта нейтрализации предсуществующими или индуцированными в ходе терапии антителами.

Таким образом, малая терапевтическая широта препаратов на основе ААВ определяет высокую степень критичности таких показателей качества, как инфекционный титр вируса и/или геномный титр, а также соотношение пустых/полных капсидов [21].

Репликативно-компетентные вирусные частицы. Репликативно-компетентные ААВ (rcAAV), способные к репликации в присутствии хелперного вируса, представляют собой капсид ААВ, содержащий гены *rep* и *cap* фланкированные ITR, то есть фактически являются вирусами дикого или псевдодикого типа. Образование rcAAV происходит из-за рекомбинации между ITR, присутствующими в векторной упаковочной плазмиде, и последовательностями *rep/cap*, которые находятся во вспомогательных плаزمиде [22]. Следует отметить, что использование ITR и *rep* вируса ААВ2 эффективно снижает рекомбинацию и приводит к более низкому уровню rcAAV [23]. Используемые в настоящее время подходы для производства оптимизированы для снижения количества rcAAV до уровня менее одного rcAAV на 10^8 ААВ. Соответственно, доза в 10^{12} – 10^{15} ААВ потенциально может содержать от 10^4 до 10^7 вирусов, способных к репликации [9]. Проведенные исследования *in vivo* и *in vitro* не выявили прямого влияния rcAAV на безопасность [24]. Тем не менее, принимая во внимание недостаточность информации о потенциальном негативном воздействии, можно предположить возможный риск возникновения

⁷ <https://pharmvestnik.ru/content/news/Dva-rebenka-so-SMA-umerli-pri-lechenii-preparatom-Zolgensma.html>

побочных эффектов на уровне отдельного пациента. В связи с этим уровень риска по показателю содержание гсААВ оценивается как средний.

Чистота ААВ и примеси. При производстве ААВ вирусные частицы могут подвергаться различным физико-химическим изменениям, таким как агрегация, деграция, окисление и др., что может негативно повлиять на эффективность и безопасность продукта. Поэтому важно определить и контролировать эти изменения, применяя соответствующие стратегии для оптимизации процессов культивирования, очистки и хранения частиц ААВ. Эти стратегии аналогичны тем, которые используются для рекомбинантных белков и вакцинных продуктов.

Наиболее часто встречается дезаминирование остатков аспарагина и глутамин в белке VP3 капсида, уровень которого может достигать 99% (для ААВ8) [25]. Уровень дезаминирования увеличивается во время сборки ААВ в процессе культивирования и не связан с процессом очистки. Степень дезаминирования может влиять на активность трансдукции *in vitro* и в целом на эффективность препарата [25, 26]. Однако в настоящее время отсутствует точная информация о том, какой уровень дезаминирования ААВ может влиять на трансдукционную активность. Гликозилирование белков редко встречается у ААВ [27], тем не менее сайты N-гликозилирования в белках капсида присутствуют [28]. Так как вероятность влияния дезаминирования или гликозилирования белков капсида на трансдукционную активность или иммуногенность невысока, то по данным показателям присваивается низкий уровень риска.

Остаточная ДНК клеток-продуцентов и остаточная плазмидная ДНК. Метод очистки, применяемый в производстве ААВ, включает использование нуклеаз и последующую хроматографию, что позволяет практически полностью удалить из конечного продукта внекапсидную ДНК. Однако во время сборки вирусных частиц в клетках иногда происходит случайное включение фрагментов ДНК клеток-продуцентов или плазмидной ДНК в капсиды. В очищенном препарате ААВ доля капсидов с фрагментами геномной ДНК клеток-продуцентов обычно варьирует в диапазоне от 0,04 до 3% [29], но может достигать 8% [24]. Такие фрагменты могут содержать открытую рамку считывания или регуляторные генетические элементы генома клеток, использующихся для сборки вируса. Так, например, при сборке вируса в клетках линии HEK293T возможно включение генов

аденовируса E1 или Т-антигена SV40, а при сборке в клетках HeLa – генов вируса папилломы человека E6 и E7. В исследованиях *in vivo* показано, что риск онкогенеза, связанный с присутствием фрагментов геномной ДНК продуцента, минимальный [30], тем не менее теоретическую вероятность реализации такого риска исключить нельзя.

Плазмидная ДНК, используемая при производстве ААВ, так же как ДНК клеток-продуцентов, может быть включена в капсид вируса в процессе его сборки, и уровень ее содержания может составлять до 8% от геномной ДНК ААВ [17, 29]. В остаточной плазмидной ДНК возможно присутствие потенциально генотоксических последовательностей, таких как гены *rep* и *cap*, гены антибиотиков, регуляторные элементы плазмид, гены E2A и E4 [31]. Для инкапсулированной плазмидной ДНК показана возможность трансдукции *in vivo*. Так, в исследовании *in vivo* показано, что после введения животным (макаке или собаке) препарата ААВ, содержащего приблизительно 1,3% капсидов с геном *ampR*, были обнаружены последовательности этого гена в тканях [32]. По результатам оценки препарата Глибера Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration) были выражены опасения о безопасности препарата из-за наличия открытых рамок считывания в капсидах бакуловируса, используемого как хелперный вирус при производстве этого препарата, что могло привести к экспрессии бакуловирусного белка в тканях пациента⁸. Между тем ни в одном клиническом исследовании не было выявлено каких-либо прямых доказательств взаимосвязи побочных эффектов с содержанием инкапсулированной плазмидной ДНК. Так, в исследованиях с применением препаратов ААВ, содержащих 0,018% последовательности *cap* [31], или 0,002% последовательности *rep*-ITR, или 1,87% последовательности гена устойчивости к канамицину [17], не было выявлено каких-либо дополнительных генотоксических эффектов. В связи с вышеописанным уровень риска для показателя остаточной ДНК клеток-продуцентов и плазмидной ДНК можно оценить как умеренный.

Остаточные белки клеток-продуцентов. Влияние остаточных белков клеток-продуцентов хорошо изучено на примере лекарственных препаратов на основе рекомбинантных белков или антител. В настоящее время регуляторными органами разных стран установлены пределы

⁸ Glybera. Product Information. EMA; 2017.

содержания остаточных белков продуцента в диапазоне от 1 до 100 ppm⁹, что при дозе 10 мг рекомбинантного белка составляет от 0,01 до 1 мкг. Доза, равная в 10¹⁵ вирусных частиц, включает приблизительно 10 мг капсидов, из которых около 6,5 мг приходится на белки и около 3,5 мг на ДНК. Соответственно, рекомендуемое максимальное содержание остаточных белков клеток-продуцентов на дозу в 10¹⁵ вирусных частиц не должно превышать 1 мкг.

Технологические примеси. В ходе производства есть вероятность попадания в препарат ААВ примесей таких материалов технологического процесса, как компоненты и добавки питательных сред (индукторы, антибиотики и др.), лиганды хроматографических сорбентов, компоненты буферов (детергенты, соли тяжелых металлов), ферменты (нуклеаза). Наличие таких примесей в препарате несет определенные риски, и поэтому их наличие и содержание должно контролироваться. При определении целевого профиля продукта все подобные примеси должны быть рассмотрены с точки зрения влияния на безопасность, эффективность и стабильность целевого ААВ. Для большинства этих компонентов влияние хорошо изучено в доклинических и/или клинических исследованиях, и для них можно установить диапазоны значений показателей на основе соответствующих нормативных требований¹⁰ [33].

При производстве вирусных векторов (не только ААВ) используется эндонуклеаза, способная расщеплять ДНК и РНК. Известно, что ДНКаза I и РНКаза содержатся в крови человека в концентрации около 3 нг/мл [34]. Кроме того, зарегистрирована и используется в качестве лекарственного средства ДНКаза I (дорназа альфа). Влияние на безопасность каталитической активности этого фермента считается минимальным. Тем не менее существуют риски развития аллергической реакции при применении препарата, содержащего остаточную нуклеазу.

В процессе очистки ААВ применяется ультрацентрифугирование в градиенте плотности, и для создания градиента обычно используется цезия хлорид (CsCl), сахароза или йодиксанол. Цезий является тяжелым металлом, и его остаточные примеси могут оказывать негативное влияние на организм человека, в связи с чем предпочтительна его замена на альтернативные реагенты. Сахароза и йодиксанол входят в состав многих лекарственных средств, и влияние их остаточных примесей в низких концентрациях

на безопасность препарата ААВ можно оценить как минимальное.

Наличие примеси таких компонентов, как бактерии, микоплазмы, вирусы, в том числе репликативно-компетентные ААВ, и эндотоксины, относятся к критическим показателям качества продукта в связи с непосредственным влиянием на безопасность применения препарата. Из-за большого количества данных исследований по этим компонентам и соответствующих нормативных требований в фармакопеях и рекомендациях регуляторных органов разных стран степень неопределенности по данным показателям можно оценить как низкую.

Применение подхода QbD для разработки препарата на основе ААВ вектора для терапии миодистрофии Дюшенна

Разработка ГенЛП для лечения миодистрофии Дюшенна является одним из приоритетных направлений, что обусловлено наиболее высокой частотой этого заболевания среди наследственных нервно-мышечных болезней человека. В настоящее время в АО «ГЕНЕРИУМ» проводятся исследования по разработке инновационного ГенЛП на основе ААВ для лечения миодистрофии Дюшенна. Общая схема производства представлена на *рисунке 2*.

В соответствии с принципами QbD на первом этапе был определен целевой профиль качества разрабатываемого продукта и затем рассмотрен производственный процесс для формирования стратегии контроля показателей качества. Затем были оценены и ранжированы риски по каждому из показателей, установлены оптимальные методы контроля качества и диапазоны допустимых значений (*табл. 3*).

Специфическую биологическую активность определяли с помощью клеточного теста с последующим количественным определением РНК гена микродистрофина (micro-dystrophin, *micro-DMD*), а также по уровню экспрессии белка микродистрофина с использованием методов ИФА и вестерн-блота. Экспрессия белка и РНК подтверждена.

Титр вирусного генома устанавливали с помощью методов ПЦР-РВ и цифровой ПЦР. Для более точного определения титра в обоих методах использовали две пары праймеров к ITR и целевому гену микродистрофина. Методы были валидированы с использованием стандартного образца (RS-AAB9, Charles River Laboratories, США). Для последующих доклинических

⁹ General Chapter <1132> Residual host cell protein measurement in biopharmaceuticals. United States Pharmacopeia. USP39–NF34.

¹⁰ ОФС.1.9.1.0001.18 Генотерапевтические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. 2018.



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

Рис. 2. Схема производства препарата на основе аденоассоциированного вируса (ААВ) для лечения миодистрофии Дюшенна.

Fig. 2. Production scheme for an AAV-based product for Duchenne muscular dystrophy.

и клинических исследований был установлен диапазон 10^{13} – 10^{14} вг/мл.

Для определения инфекционного титра использовали клеточный тест в сочетании с ПЦР-РВ. Клетки (HeLaRC32) инфицировали аденовирусным хелперным вирусом и производили серийные разведения гААВ вектора. После заражения проводили оценку с помощью ПЦР-РВ и рассчитывали значение 50% тканевой цитопатической дозы (ТЦД₅₀). Диапазон значений показателя был установлен на основе литературных данных [18, 35].

Подлинность определяли с использованием нескольких методов: с помощью вестерн-блота идентифицировали белки VP1, VP2, VP3; с помощью ПЦР устанавливали целостность вирусного генома с использованием пар праймеров для получения перекрывающихся последовательностей. Полная последовательность генома ААВ была установлена методом секвенирования. Средний размер вирусных частиц ААВ определяли с помощью метода динамического светорассеяния с применением анализатора Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd, Великобритания).

Стерильность и эндотоксины определяли в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)¹¹. Диапазон значений показателя «Эндотоксины» устанавливали из расчета не более 5 ЕЭ/кг (на массу тела пациента) при внутривенном введении исходя из максимальной возможной дозы в 10^{15} вг. Посторонние вирусы и микоплазму детектировали с помощью ПЦР-РВ, следуя рекомендациям ГФ РФ¹².

Для определения репликативных ААВ применяли клеточный тест с последующей ПЦР-РВ. В тесте использовали перmissive клеточную линию (HEK293) с несколькими циклами последовательного заражения для увеличения чувствительности метода.

Степень чистоты белков капсида определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и метода капиллярного электрофореза. Диапазон показателя был установлен на основе валидации метода и определения нижнего предела обнаружения и составил не менее 95%.

¹¹ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

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

¹² ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Таблица 3. Показатели качества для препарата на основе аденоассоциированного вируса (ААВ) для лечения миодистрофии Дюшенна

Table 3. Quality attributes for an AAV-based gene therapy for Duchenne muscular dystrophy

Показатель качества <i>Quality attribute</i>	Уровень риска <i>Risk level</i>	Аналитический метод <i>Analytical procedure</i>	Установленный диапазон <i>Specification</i>
Микробиологическая и вирусная безопасность <i>Microbiological and viral safety</i>			
Стерильность <i>Sterility</i>	10	Метод прямого посева <i>Direct inoculation</i>	Стерильно <i>Sterile</i>
Эндотоксины <i>Bacterial endotoxins</i>	10	LAL-тест <i>LAL-test</i>	0,75 ЕЭ/мл <i>0.75 EU/mL</i>
Репликативно-компетентные ААВ <i>Replication-competent AAVs</i>	10	Клеточный тест <i>Cell-based assay</i>	Должны отсутствовать <i>Free of detectable replication-competent AAVs</i>
Посторонние вирусы <i>Adventitious viral agents</i>	10	ПЦР-РВ <i>RT-PCR</i>	Должны отсутствовать <i>Free of detectable adventitious viral agents</i>
Микоплазмы <i>Mycoplasma</i>	10	ПЦР-РВ <i>RT-PCR</i>	Должны отсутствовать <i>Free of detectable mycoplasma</i>
Подлинность <i>Identity</i>			
Белки капсида <i>Capsid proteins</i>	10	Вестерн-блот <i>Western blotting</i>	Наличие всех белков <i>All proteins present</i>
Последовательность терапевтического гена <i>Sequence of the gene of interest</i>	10	ПЦР <i>PCR</i>	Наличие гена <i>Gene of interest present</i>
Целостность вирусного генома <i>Viral genome integrity</i>	10	ПЦР-РВ, секвенирование <i>RT-PCR, sequencing</i>	Присутствуют полные вирусные геномы <i>Complete viral genomes present</i>
Средний размер вирусных частиц <i>Average viral particle size</i>	10	Динамическое светорассеяние <i>Dynamic light scattering</i>	От 28 до 33 нм <i>From 28 to 33 nm</i>
Содержание и активность ААВ <i>AAV content and strength</i>			
Биологическая (специфическая) активность <i>Biological activity (potency)</i>	10	Клеточный тест <i>Cell-based assay</i>	Наличие экспрессии гена <i>Gene expression present</i>
Титр вирусного генома <i>Vector genome titre</i>	20	ПЦР-РВ, цифровая ПЦР <i>RT-PCR, dPCR</i>	10^{13} – 10^{14} вг/мл <i>10^{13}–10^{14} vg/mL</i>
Инфекционный титр <i>Infectious titre</i>	30	Клеточный тест <i>Cell-based assay</i>	Не менее 10^9 МЕ <i>$\geq 10^9$ ME</i>
Чистота ААВ / Примеси <i>AAV purity / Impurities</i>			
Остаточные белки клеток-продуцентов <i>Residual host-cell protein</i>	1	ИФА <i>ELISA</i>	Не более 10 нг на 10^{13} вг <i>≤ 10 ng per 10^{13} vg</i>
Остаточная ДНК клеток-продуцентов <i>Residual host-cell DNA</i>	3	ПЦР-РВ <i>RT-PCR</i>	Не более 115 нг на 10^{13} вг <i>≤ 115 ng per 10^{13} vg</i>
Остаточная плазмидная ДНК <i>Residual plasmid DNA</i>	3	ПЦР-РВ <i>RT-PCR</i>	Не более 680 нг на 10^{13} вг <i>≤ 680 ng per 10^{13} vg</i>
Остаточный трансфекционный агент <i>Residual transfection reagent</i>	3	ВЭЖХ <i>HPLC</i>	В процессе установления* <i>To be established*</i>
Остаточный лиганд с сорбента <i>Residual sorbent ligand</i>	3	ИФА <i>ELISA</i>	Не более 100 нг на мл <i>≤ 100 ng per mL</i>

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

Показатель качества <i>Quality attribute</i>	Уровень риска <i>Risk level</i>	Аналитический метод <i>Analytical procedure</i>	Установленный диапазон <i>Specification</i>
Остаточная эндонуклеаза <i>Residual endonuclease</i>	3	ИФА <i>ELISA</i>	Не более 1 нг на 10^{13} вг $\leq 1 \text{ ng per } 10^{13} \text{ vg}$
Остаточный йодиксанол <i>Residual iodixanol</i>	3	ВЭЖХ <i>HPLC</i>	Не более 10 мкг на 1 мл $\leq 10 \text{ } \mu\text{g per mL}$
Чистота белков капсида <i>Capsid protein purity</i>	3	ЭФ в ПААГ, капиллярный ЭФ <i>PAGE electrophoresis, capillary electrophoresis</i>	Не менее 95% $\geq 95\%$
Пустые капсиды <i>Empty capsids</i>	20	Ультрацентрифугирование <i>Ultracentrifugation</i>	Не более 5% $\leq 5\%$
Агрегаты <i>Aggregates</i>	10	ВЭЖХ <i>HPLC</i>	Не более 4% $\leq 4\%$

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

Примечание. ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; ИФА – иммуноферментный анализ; LAL-тест – тест с использованием лизата амебоцитов *Limulus*; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ЭФ в ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле; вг – вирусный геном.

* – в настоящее время диапазон не установлен, ведутся исследования.

Note. PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, real-time PCR; dPCR, digital PCR; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; LAL-test, *Limulus* amoebocyte lysate test; HPLC, high-performance liquid chromatography; PAGE, polyacrylamide gel; vg, virus genome.

* The specification is currently not established; the research is ongoing.

Наличие пустых капсидов и седиментационное распределение вирусных частиц анализировали с помощью аналитического ультрацентрифугирования с применением оборудования Optima AUC (Beckman Coulter, США). В качестве значения показателя количества пустых капсидов был установлен диапазон «не более 5%» исходя из литературных данных [15, 18, 36], полученных в клинических исследованиях, и собственных данных, основанных на разработке процесса производства. Указанный диапазон является более строгим, чем описанный в литературе.

Содержание остаточных белков клеток-продуцентов, лиганда хроматографического сорбента и эндонуклеазы определяли с помощью метода ИФА. Установленный диапазон значений показателя остаточных белков был рассчитан на основании подхода, представленного в разделе «Оценка риска для показателей качества ААВ вектора», и составил не более 10 нг на 10^{13} вг.

Остаточную ДНК клеток-продуцентов и плазмидную ДНК определяли с помощью метода ПЦР-РВ. Согласно имеющимся данным значение показателя содержания остаточной ДНК в вирусных частицах ААВ обычно находится в пределах 1–3% [24, 17, 29], что при пересчете на однократную дозу препарата может составлять несколько микрограмм. Для остаточной плазмидной ДНК доля вирусных частиц с последовательностями плазмид может составлять до 8% (как указано в разделе «Оценка риска для показателей качества ААВ вектора»),

что при пересчете на однократную дозу препарата может достигать до 10 мкг. На основании приведенных выше данных, а также результатов валидации методик установлен диапазон по содержанию остаточной ДНК – не более 115 нг на 10^{13} вг, и остаточной плазмидной ДНК – не более 680 нг на 10^{13} вг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках концепции «качество через дизайн» (Quality by Design, QbD) с применением метода оценки риска для показателей качества на основе международного опыта, а также с учетом данных АО «ГЕНЕРИУМ» по разработке и производству препарата на основе аденоассоциированного вируса для лечения миодистрофии Дюшенна проведено определение целевого профиля продукта и установлены критические показатели качества. Разработаны методы контроля показателей качества ААВ и установлены диапазоны значений этих показателей. Описана схема технологического процесса получения ААВ и стратегия контроля качества, реализованные при разработке генотерапевтического лекарственного препарата для проведения последующих доклинических и клинических исследований.

Реализация основных положений концепции QbD позволяет соответствовать высоким стандартам качества при проведении фармацевтической разработки генотерапевтических препаратов, а также успешно осуществлять масштабирование и трансфер технологического процесса на производство.

Литература/References

1. Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Горенков ДВ, Хантимирова ЛМ, Гусева СГ, Меркулов ВА. Проблемные аспекты разработки и регистрации генотерапевтических препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):6–22. Soldatov AA, Avdeeva ZhI, Gorenkov DV, Khantimirova LM, Guseva SG, Merkulov VA. Challenges in development and authorisation of gene therapy products. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):6–22 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-6-22>
2. Kolesnik VV, Nurtidinov RF, Oloruntimehin ES, Karabelsky AV, Malogolovkin AS. Optimization strategies and advances in the research and development of AAV-based gene therapy to deliver large transgenes. *Clin Transl Med*. 2024;14(3):e1607. <https://doi.org/10.1002/ctm2.1607>
3. Егорова ТВ, Пискунов АА, Потеряев ДА. Генная терапия наследственных заболеваний на основе аденоассоциированных вирусных векторов: современные проблемы применения и пути их решения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(2):123–39. Egorova TV, Piskunov AA, Poteryaev DA. Adeno-associated virus vector-based gene therapy for hereditary diseases: Current problems of application and approaches to solve them. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(2):123–39 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-123-139>
4. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):583–93. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-08>
5. Brister JR, Muzyczka N. Mechanism of Rep-mediated adeno-associated virus origin nicking. *J Virol*. 2000;74(17):7762–71. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.17.7762-7771.2000>
6. McCarty DM, Ryan JH, Zolotukhin S, Zhou X, Muzyczka N. Interaction of the adeno-associated virus Rep protein with a sequence within the A palindrome of the viral terminal repeat. *J Virol*. 1994;68(8):4998–5006. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.8.4998-5006.1994>
7. Issa SS, Shaimardanova AA, Solovyeva VV, Rizvanov AA. Various AAV serotypes and their applications in gene therapy: An overview. *Cells*. 2023;12(5):785. <https://doi.org/10.3390/cells12050785>
8. Wang J-H, Gessler DJ, Zhan W, Gallagher TL, Gao G. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):78. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01780-w>
9. Penaud-Budloo M, François A, Clément N, Ayuso E. Pharmacology of recombinant adeno-associated virus production. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;8:166–80. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.01.002>
10. Juran JM. *Juran on quality by design: the new steps for planning quality into goods and services*. Free Press; 1992.
11. François A, Bouzelha M, Lecomte E, Broucq F, Penaud-Budloo M, Adjali O, et al. Accurate titration of infectious AAV particles requires measurement of biologically active vector genomes and suitable controls. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;10:223–36. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.07.004>
12. Gimpel AL, Katsikis G, Sha S, Maloney AJ, Hong MS, Nguyen TNT, et al. Analytical methods for process and product characterization of recombinant adeno-associated virus-based gene therapies. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2021;20:740–54. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.02.010>
13. Lock M, Alvira MR, Chen S-J, Wilson JM. Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR. *Human Gene Ther Methods*. 2014;25(2):115–25. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2013.131>
14. Dobnik D, Kogovsek P, Jakomin T, Kosir N, Tusek Znidaric M, Leskovec M, et al. Accurate quantification and characterization of adeno-associated viral vectors. *Front Microbiol*. 2019;10:1570. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01570>
15. Gao K, Li M, Zhong L, Su Q, Li J, Li S, et al. Empty virions in AAV8 vector preparations reduce transduction efficiency and may cause total viral particle dose-limiting side effects. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2014;1(9):20139. <https://doi.org/10.1038/mtm.2013.9>
16. Grieger JC, Soltys SM, Samulski RJ. Production of recombinant adeno-associated virus vectors using suspension HEK293 cells and continuous harvest of vector from the culture media for GMP FIX and FLT1 clinical vector. *Mol Ther*. 2016;24(2):287–97. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.187>
17. Allay JA, Sleep S, Long S, Tillman DM, Clark R, Carney G, et al. Good manufacturing practice production of self-complementary serotype 8 adeno-associated viral vector for a hemophilia B clinical trial. *Hum Gene Ther*. 2011;22(5):595–604. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.202>
18. Kaspar BK, Hatfield JM, Balleydier J, Kaspar AA, Hodge RE. Means and method for producing and purifying viral vectors. Patent of the United States No. US 2021/0317474 A1; 2021.
19. Yang TY, Braun M, Lembke W, McBlane F, Kamerud J, DeWall S, et al. Immunogenicity assessment of AAV-based gene therapies: An IQ consortium industry white paper. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2022;26:471–94. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.07.018>
20. Martini AT, Suzuki M, Markusic DM, Zolotukhin I, Ryals RC, Moghimi B, et al. The genome of self-complementary adeno-associated viral vectors increases Toll-like receptor 9-dependent innate immune responses in the liver. *Blood*. 2011;117(24):6459–68. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-314518>
21. Kishimoto TK, Samulski RJ. Addressing high dose AAV toxicity – ‘one and done’ or ‘slower and lower’? *Expert Opin Biol Ther*. 2022;22(9):1067–71. <https://doi.org/10.1080/14712598.2022.2060737>
22. Allen JM, Debelak DJ, Reynolds TC, Miller AD. Identification and elimination of replication-competent adeno-associated virus (AAV) that can arise by nonhomologous recombination during AAV vector production. *J Virol*. 1997;71(9):6816–22. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.9.6816-6822.1997>
23. Song L, Samulski RJ, Hirsch ML. Adeno-associated virus vector mobilization, risk versus reality. *Hum Gene Ther*. 2020;31(19–20):1054–67. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.118>
24. Wright J. Product-related impurities in clinical-grade recombinant AAV vectors: Characterization and risk assessment. *Biomedicines*. 2014;2(1):80–97. <https://doi.org/10.3390/biomedicines2010080>
25. Giles AR, Sims JJ, Turner KB, Govandasamy L, Alvira MR, Lock M, Wilson JM. Deamidation of amino acids on the surface of adeno-associated virus capsids leads to charge heterogeneity and altered vector function. *Mol Ther*. 2018;26(12):2848–62. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.09.013>
26. Rumachik NG, Malaker SA, Poweleit N, Maynard LH, Adams CM, Leib RD, et al. Methods matter: Standard production platforms for recombinant AAV produce chemi-

- cally and functionally distinct vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020;18:98–118.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.05.018>
27. Murray S, Nilsson CL, Hare JT, Emmett MR, Korostelev A, Ongley H, et al. Characterization of the capsid protein glycosylation of adeno-associated virus type 2 by high-resolution mass spectrometry. *J Virol.* 2006;80(12):6171–6.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02417-05>
 28. Aloor A, Zhang J, Gashash EA, Parameswaran A, Chrzanoski M, Ma C, et al. Site-specific N-glycosylation on the AAV8 capsid protein. *Viruses.* 2018;10(11):644.
<https://doi.org/10.3390/v10110644>
 29. Lecomte E, Tournaire B, Cogne B, Dupont JB, Lindenbaum P, Martin-Fontaine M, et al. Advanced characterization of DNA molecules in rAAV vector preparations by single-stranded virus next-generation sequencing. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015;4(10):e260. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.32>
 30. Sheng L, Cai F, Zhu Y, Pal A, Athanasiou M, Orrison B, et al. Oncogenicity of DNA *in vivo*: Tumor induction with expression plasmids for activated H-ras and c-myc. *Biologicals.* 2008;36(3):184–97.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2007.11.003>
 31. Nauck B, Murphy SL, Smith PH, Qu G, Liu X, Zeleniaia O, et al. Undetectable transcription of *cap* in a clinical AAV vector: Implications for preformed capsid in immune responses. *Mol Ther.* 2009;17(1):144–52.
<https://doi.org/10.1038/mt.2008.227>
 32. Chadeuf G, Ciron C, Moullier P, Salvetti A. Evidence for encapsidation of prokaryotic sequences during recombinant adeno-associated virus production and their *in vivo* persistence after vector delivery. *Mol Ther.* 2005;12(4):744–53.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.06.003>
 33. Астапова ОВ, Берчатова АА. Генотерапевтические препараты: аспекты доклинического изучения безопасности. *Безопасность и риск фармакотерапии.* 2023;11(1):73–96. Астапова ОВ, Берчатова АА. Gene therapy medicinal products: Non-clinical safety studies. *Safety and Risk of Pharmacotherapy.* 2023;11(1):73–96 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-1-329>
 34. Prince WS, Baker DL, Dodge AH, Ahmed AE, Chestnut RW, Sinicropi DV. Pharmacodynamics of recombinant human DNase I in serum. *Clin Exp Immunol.* 2001;113(2):289–96.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00647.x>
 35. Duong T, McAllister J, Eldahan K, Wang J, Onishi E, Shen K, et al. Improvement of precision in recombinant adeno-associated virus infectious titer assay with droplet digital PCR as an endpoint measurement. *Hum Gene Ther.* 2023;34(15–16):742–57.
<https://doi.org/10.1089/hum.2023.014>
 36. Schnödt M, Büning H. Improving the quality of adeno-associated viral vector preparations: The challenge of product-related impurities. *Hum Gene Ther Methods.* 2017;28(3):101–8.
<https://doi.org/10.1089/hgtb.2016.188>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещена *таблица 1*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-580-table1>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Вклад распределен следующим образом: **Д.С. Копейн** – концепция исследования, написание и редактирование текста рукописи, систематизация и обобщение данных литературы; **Г.Н. Порошин** – анализ и обобщение данных литературы, участие в написании текста рукописи; **Р.А. Хамитов** – формулирование выводов исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Р.Р. Шукурову за помощь и консультации при обсуждении результатов.

Additional information. *Table 1* is published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-580-table1>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **D.S. Kopein** conceptualised the study, drafted and edited the manuscript, and collated and summarised literature data. **G.N. Poroshin** analysed and summarised literature data and drafted the manuscript. **R.A. Khamitov** formulated the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The authors are thankful to R.R. Shukurov for his help and advice in discussing the results.

Об авторах / Authors

Копейн Дамир Сергеевич, канд. биол. наук / **Damir S. Kopein**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1176-5829>

Порошин Григорий Николаевич / **Grigory N. Poroshin**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3754-9198>

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф. / **Ravil A. Khamitov**, Dr. Sci. (Med.), Prof.

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

Поступила 10.04.2024

После доработки 11.09.2024

Принята к публикации 12.09.2024

Online first 14.02.2025

Received 10 April 2024

Revised 11 September 2024

Accepted 12 September 2024

Online first 14 February 2025



Применение принципов 3Rs для оценки качества АКДС-вакцины: преимущества и недостатки

Е.И. Комаровская , О.В. Проскурина

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

 Комаровская Елена Игоревна; Komarovskaya@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Для определения специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов в составе АКДС-вакцин крупные мировые производители, следуя принципам 3Rs (замена, уменьшение, усовершенствование), активно применяют современные альтернативные методы *in vivo* и *in vitro*. На сегодняшний день некоторые альтернативные методы полностью заменили методы *in vivo*. В Российской Федерации принципы 3Rs для оценки качества АКДС-вакцины практически не применяются. Процесс гармонизации Государственной фармакопеи Российской Федерации с требованиями региональной фармакопеи Евразийского экономического союза (ЕАЭС) обуславливает необходимость проведения анализа современных методов контроля качества АКДС-вакцин.

ЦЕЛЬ. Провести сравнительный анализ современных методов определения специфической активности компонентов АКДС-вакцины, оценить их преимущества и недостатки, выявить проблемные вопросы гармонизации методов в рамках ЕАЭС.

ОБСУЖДЕНИЕ. В Европейском союзе принципы 3Rs являются неотъемлемой частью законодательства. Благодаря исследованиям под эгидой ВОЗ и Европейского директората по качеству лекарственных средств и здравоохранения (EDQM) в некоторых тестах удалось полностью отказаться от использования лабораторных животных или заменить их на более гуманные, облегчающие страдания животных. Альтернативные серологические методы для контроля качества АКДС-вакцины считают щадящими, но они не исключают использование животных, которых иммунизируют для последующего получения образцов крови. Для постановки альтернативных методов определения специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов требуются дополнительные материалы, реактивы, стандартные образцы, специальное оборудование и статистическое программное обеспечение. Методы многоэтапны, требуют вовлечения большего числа специалистов. Альтернативный серологический метод на основе ИФА обладает определенным преимуществом перед методом летального заражения. В нем исключено использование токсинов и доступно определение содержания сразу двух видов защитных антител в образцах сыворотки крови, полученных от одного животного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Несмотря на активное развитие и внедрение методов контроля качества вакцин *in vitro*, для дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины методы летального заражения более экономичны, просты в исполнении и позволяют оценить прямое протективное действие вакцины. Из альтернативных методов для контроля качества АКДС-вакцины наиболее перспективным является метод на основе иммуноферментного анализа.

Ключевые слова: принципы 3Rs; альтернативные методы; АКДС-вакцина; методы *in vivo*; методы *in vitro*; серологические методы; специфическая активность; дифтерийный анатоксин; столбнячный анатоксин; коклюшный компонент

Для цитирования: Комаровская Е.И., Проскурина О.В. Применение принципов 3Rs для оценки качества АКДС-вакцины: преимущества и недостатки. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(2):156–169. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-156-169>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Application of 3Rs principles to assess the quality of DPT vaccine: Advantages and disadvantages

Elena I. Komarovskaya , Olga V. Proskurina

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

✉ Elena I. Komarovskaya; Komarovskaya@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Global vaccine manufacturers actively use modern alternative *in vivo* and *in vitro* tests to assess the potency of diphtheria and tetanus toxoids in the DPT vaccine, following 3Rs principles (replacement, reduction, refinement). At present, some *in vivo* tests have been completely replaced with alternative tests. In the Russian Federation, the 3Rs principles for quality assessment of DPT vaccine are practically not applied. The process of harmonization of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation with the requirements of the regional pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union (EAEU) necessitates the analysis of modern tests for quality assessment of DPT vaccines.

AIM. To conduct a comparative analysis of modern tests for potency determination of DPT vaccine components, assess advantages and disadvantages of tests, and identify problematic issues in harmonizing tests within the pharmacopoeia of EAEU.

DISCUSSION. In the European Union, the 3Rs principles are an integral part of the legislation. Due to investigations under the auspices of WHO and the European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM), the use of laboratory animals have been completely excluded from some tests or replaced with more sparing tests that alleviate the suffering of animals. Alternative serological tests of DPT vaccine are considered sparing, but they include animals that are immunized for subsequent collection of blood samples. To establish alternative tests for potency assessment of diphtheria and tetanus toxoid, additional materials, reagents, standards, special equipment, and statistical software are required. They are multi-stage and a larger number of skilled specialists are needed. Alternative serological tests based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) have a certain advantage over the lethal challenge method: exclusion of toxins usage and determination of two types of protective antibodies in the blood serum samples obtained from one animal.

CONCLUSIONS. Despite the active development and implementation of *in vitro* tests for quality control of the diphtheria and tetanus components of the DPT vaccine, lethal challenge methods are more cost-effective, easy to perform and adapted to assess the direct protective effect of the vaccine. It should be noted that ELISA is the most promising test of the alternative tests applied for quality control of the DPT vaccine.

Keywords: 3Rs principles; alternative tests; DPT vaccine; *in vivo* tests; *in vitro* tests; serological tests; vaccine potency; diphtheria toxoid; tetanus toxoid; pertussis component

For citation: Komarovskaya E.I., Proskurina O.V. Application of 3Rs principles to assess the quality of DPT vaccine: Advantages and disadvantages. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(2):156–169. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-156-169>

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. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

АКДС-вакцина является одной из важнейших вакцин национальных календарей всех стран мира. Применение АКДС-вакцины позволило значительно снизить заболеваемость и связанную с ней смертность при реализации программ плановой иммунизации. Специфическая активность и безопасность — одни из основных показателей качества вакцины, и для их контроля требуется использование лабораторных животных на каждой стадии производства вакцины.

На момент разработки и регистрации АКДС-вакцины методы исследования на животных (далее — методы *in vivo*) были самыми передовыми. С 1959 г., когда впервые были выдвинуты принципы 3Rs (replacement, reduction and refinement of animal assays — замена, уменьшение, усовершенствование), ученые начали поиски новых методов контроля качества вакцин с целью замены и уменьшения количества лабораторных животных, используемых в различных испытаниях. Методы *in vivo* применяли на всех стадиях производства вакцины, и их замена альтернативными методами оказалась сложной задачей [1–4]. Производители вакцин в 1970-х годах, следуя принципам 3Rs, начали поиск методов *in vitro*, которые могли бы стать надежной альтернативой традиционным методам *in vivo* для оценки безопасности и специфической активности компонентов АКДС-вакцины.

С начала 90-х годов прошлого столетия в практику контроля показателей качества иммунобиологических препаратов начали постепенно внедрять альтернативные серологические методы. Однако не все производители вакцин и регуляторные органы оказались готовы к переходу от методов *in vivo* к методам *in vitro*. В июле 2021 г. Национальный центр Великобритании¹ по замене, усовершенствованию и сокращению использования животных в исследованиях (NC3Rs) по поручению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) провел опрос производителей с целью проанализировать, в какой степени методы *in vivo* описаны в руководствах и рекомендациях по производству и контролю качества вакцин и биотерапевтических препаратов. Большинство участников (66%) ответили, что на производстве применяют только методы *in vivo*, поскольку результаты этих исследований

принимают все региональные регуляторные органы [5].

Основными препятствиями были и остаются различия нормативных требований в разных странах, а также большая осторожность производителей вакцин и регуляторных органов в отношении изменения методов оценки качества иммунобиологических препаратов и вакцин [6]. Проблемы, связанные с разработкой и внедрением альтернативных методов, обусловлены необходимостью продемонстрировать сопоставимость результатов нового и утвержденного (*in vivo*) методов и валидировать альтернативный метод в соответствии с требованиями Международного совета по гармонизации ICH Q2(R1)².

В Европейском союзе (ЕС) следование принципам 3Rs является юридическим требованием. В отношении АКДС-вакцины внесен ряд изменений, которые отражены в Европейской фармакопее (ЕФ), включая возможность совмещения тестов на реверсию токсичности и специфическую безопасность на культуре клеток Vero при оценке качества дифтерийного анатоксина (ДА). Для столбнячного анатоксина (СА) исключены испытания на реверсию токсичности, теста на аномальную токсичность и специфическую безопасность в готовой форме препарата. Для оценки специфической активности вакцин разрешены альтернативные серологические методы³.

Отсутствие всемирно гармонизированных нормативных требований с альтернативными методами является одной из основных причин, по которой вакцинная промышленность не смогла полностью внедрить описанные в ЕФ альтернативные испытания [7].

Российская Федерация в последние годы участвует в работе по созданию единых подходов к оценке качества вакцинных препаратов в странах — членах Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Одним из основных условий данной работы является гармонизация нормативных требований ЕАЭС с рекомендациями ЕФ.

Цель работы — провести сравнительный анализ современных методов определения специфической активности компонентов АКДС-вакцины, оценить их преимущества и недостатки, выявить проблемные вопросы гармонизации методов в рамках ЕАЭС.

¹ <https://nc3rs.org.uk/>

² ICH Harmonized Tripartite Guideline Q2(R1). Validation of analytical procedures text and methodology. ICH; 2005. [https://database.ich.org/sites/default/files/Q2\(R1\)%20Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q2(R1)%20Guideline.pdf)

³ Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

Diphtheria and tetanus vaccine (adsorbed), version 01/2021:0444. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2024. www.pheur.edqm.eu/home

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Общие сведения о принципах 3Rs

Принципы 3Rs впервые определены У. Расселом и Р. Берчем в книге «Принципы гуманной экспериментальной техники» более 50 лет назад [2, 3]. Принципы были представлены в качестве основы для будущих разработок, и авторы сформулировали ее как «The 3Rs» (3Rs): replacement (замена), reduction (уменьшение), refinement (усовершенствование).

Принципы 3Rs были выдвинуты не только для того, чтобы помочь исследователям в поиске и использовании доступных методов, но и для поощрения разработки новых. Идеи Рассела и Берча вызвали огромный интерес в научном сообществе и стимулировали ученых и производителей к поиску новых методов оценки качества лекарственных препаратов. Термины «замена», «уменьшение» и «усовершенствование» впоследствии стали известны как «альтернативы» или «альтернативные методы» для сведения к минимуму боли и стресса у животных при проведении биомедицинских исследований [2, 3]. Рассел и Берч употребляли также термин «дистресс». Современное понятие «дистресс» имеет много определений. Большинство из них характеризуют дистресс как аверсивное состояние, при котором животное не способно полностью адаптироваться к стрессорам и демонстрирует неадаптивное поведение⁴.

Сформулированные Расселом и Берчем 3Rs лежат в основе современных правил⁵ использования животных и помогают найти ученым альтернативные методы исследования, основные принципы которых направлены на:

- замену – подразумевает полное или частичное исключение или замену животных в исследовательских целях. Полная замена исключает использование любых животных; частичная замена подразумевает использование некоторых видов животных, которые, основываясь на современном научном мышлении, не считаются способными испытывать страдания;
- сокращение – относится к методам, которые минимизируют количество животных, используемых в эксперименте, в соответствии с научными целями;

– усовершенствование – относится к методам, которые сводят к минимуму боль, страдания или длительный вред, причиняемый исследуемым животным, и которые улучшают их благополучие.

В настоящее время принципы 3Rs являются неотъемлемой частью законодательства во многих странах мира.

Реализация принципов 3Rs для иммунобиологических препаратов в Европейской фармакопее

В ЕС принципы 3Rs сформулированы в Директиве ЕС 2010/63/EU, что делает их реализацию юридическим требованием⁶. Во многих странах ЕС принципы 3Rs включены в национальное законодательство и положения об использовании животных в научных процедурах, а также в политику организаций, которые финансируют или проводят исследования на животных. Следует отметить, что некоторые крупнейшие производители вакцин ставят своей целью на ближайшее десятилетие полностью отказаться от тестов на животных⁷.

Европейский директорат по качеству лекарственных средств и здравоохранения (European Directorate for the Quality of Medicines, EDQM) осуществляет работу по координации коллаборативных исследований, направленных на реализацию концепции 3Rs: совместная работа по Программе биологической стандартизации, совместная деятельность Совета Европы и Комиссии Европейского союза⁸.

Эксперты ЕФ применяют одну из стратегий по реализации принципов 3Rs в разработке и внедрении фармакопейных монографий в отношении усовершенствования методов, которая заключается в использовании «гуманных конечных точек» (ГКТ) в испытаниях вакцинных препаратов. Подход к определению ГКТ основан на прекращении боли, при этом страдание экспериментального животного сведено к минимуму или уменьшено с помощью гуманной эвтаназии, прекращения болезненной процедуры или лечения для облегчения боли и/или дистресса⁹.

⁴ National Research Council (US). Committee on Pain and Distress in Laboratory Animals. Recognition and alleviation of pain and distress in laboratory animals. Washington (DC): National Academies Press; 1992.

⁵ <https://nc3rs.org.uk>

⁶ <https://sdgs.un.org/partnerships/mainstreaming-3rs-and-resource-efficiency-overall-policy-development-local-and>
https://www.meti.go.jp/english/policy/energy_environment/3r/index.html

⁷ <https://www.gsk.com/en-gb/responsibility/ethical-standards/use-of-animals/>
<https://www.fda.gov/science-research/about-science-research-fda/advancing-alternative-methods-fda>

⁸ <https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/accept-methods/apps>

https://nibsc.org/about_us/our_use_of_animals/3rs.aspx
<https://nc3rs.org.uk/who-we-are/3rs>

⁹ CCAC guidelines on choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing. CCAC; 1998.

Чтобы установить ГКТ при тестировании эффективности вакцины, необходимо определить параметры, по которым можно предсказать смертельные исходы или тяжелые клинические проявления, связанные с выполнением теста. Как правило, используются два типа ГКТ, которые основаны на клинических проявлениях теста и патофизиологических параметрах (маркеры процесса), таких как масса и температура тела [8, 9]. В частности, при определении специфической активности вакцины против столбняка в качестве ГКТ служит такая степень столбнячной интоксикации, при которой животное еще активное, но следующая стадия принесет сильные страдания и смерть (табл. 1). По международной классификации это стадия Т3 – паралич конечности, которая уже не может функционировать. Для стадии Т3 характерны тяжелые клинические проявления столбняка, поэтому гуманная эвтаназия на этом этапе уменьшит боль и страдания животного без ущерба для результатов испытания.

В качестве примера полного отказа от использования животных в экспериментальных целях можно привести метод определения специфической активности препаратов ботулинического токсина типа А для медицинского применения на культуре клеток. Традиционно это тестирование проводилось на мышах при помощи метода количественного опреде-

ления показателя LD₅₀ (количество препарата, вызывающее гибель 50% мышей при внутрибрюшинном введении), который принят в качестве «золотого стандарта». Учеными из Национального института биологических стандартов и контроля (The National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)¹⁰ был разработан метод определения специфической активности на культуре клеток (cell based potency assay, CBPA). Метод CBPA полностью заменил использование животных для оценки качества специфической активности препаратов ботулинического токсина типа А для медицинского применения в странах ЕС и США. В CBPA используется клеточная культура, которая высоко чувствительна к воздействию малых доз ботулинического нейротоксина (4–9 нг/флакон). Зачастую каждая компания-производитель самостоятельно подбирает и/или выращивает клеточную культуру под свой продукт. Это значительно увеличивает стоимость анализа и ограничивает воспроизводимость метода. В настоящее время, несмотря на активное внедрение в производственную практику методов *in vitro*, замены метода количественного определения показателя LD₅₀ на мышах пока не произошло. Метод «золотого стандарта» не исключен из ЕФ¹¹, и любой альтернативный метод *in vitro* должен быть валидирован относительно него.

Таблица 1. Клинические проявления столбнячной интоксикации у лабораторных животных (мыши и морские свинки)
Table 1. Clinical signs of tetanus intoxication of laboratory animals (mice and guinea pigs)

Стадия <i>Stage</i>	Клинические проявления <i>Clinical signs</i>
T1	Небольшая ригидность конечности, которую трудно заметить <i>Slight stiffness of one limb, which is difficult observable</i>
T2	Парез конечности, которая еще может функционировать <i>Paresis of one limb, which can still function</i>
T3	Паралич одной конечности. Животное двигается неохотно, тело из-за сколиоза часто имеет слегка бананообразную форму <i>Paralysis of one limb. An animal moves reluctantly, the body is often slightly banana-shaped owing to scoliosis</i>
T4	Конечность полностью ригидна, пальцы неподвижны. Мышечное сокращение конечности очень выражено, и обычно наблюдается сколиоз <i>The limb is completely stiff and the toes are immovable. The muscular contraction of the forelimb is very pronounced and usually scoliosis is observable</i>
T5	Столбнячные судороги, продолжительный тонический спазм мышц <i>Tetanus seizures, continuous tonic spasm of muscles</i>
+	Смерть / <i>Death</i>

Таблица составлена авторами по данным монографии 2.7.8. версия 01/2008:20708 Европейской фармакопеи¹² / *The table is prepared by the authors using general chapter 2.7.8 version 01/2008:20708 European Pharmacopoeia*

¹⁰ https://nibsc.org/about_us/our_use_of_animals/3rs.aspx

¹¹ Botulinum toxin type A for injection, version 07/2022:2113. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2024. www.pheur.edqm.eu/home

¹² General chapter 2.7.8 Assay of tetanus vaccine (adsorbed), version 01/2008:20708. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2024. www.pheur.edqm.eu/home

Следующим образом отказа от использования животных в экспериментальных целях служит тест на аномальную токсичность, который был признан широким кругом исследователей устаревшим и неспецифичным методом в отношении некоторых препаратов (вакцины, иммунные сыворотки, биотерапевтические средства, аллергены и др.). Экспертный комитет ВОЗ по биологической стандартизации (Expert Committee on Biological Standardisation, ECBS) и ЕФ, Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) и многие другие регуляторные органы исключили данный тест из своих требований в 2018 г.¹³ [10]. Однако, несмотря на это, результаты теста на аномальную токсичность по-прежнему запрашиваются регуляторными органами многих стран и/или тест используется производителями. Согласно проведенному опросу 80% респондентов осведомлены, что ВОЗ отменила требование проводить тест на аномальную токсичность, вместе с тем 57% от общего числа опрошенных по-прежнему проводят его. По мнению специалистов ВОЗ и NC3Rs такая ситуация связана с тем, что многие производители реализуют свою продукцию в нескольких регионах, где необходимо проведение данного теста в соответствии с требованиями национального законодательства [5].

Применение принципов 3Rs для оценки качества вакцины от полиомиелита является еще одним успешным примером. В течение многих лет в испытаниях вакцины на нейровирулентность использовали макаков и мартышек как единственных животных, которые восприимчивы к вирусу полиомиелита. В 90-х годах прошлого столетия была выведена трансгенная мышь, чувствительная к этому вирусу¹⁴ [11, 12]. Специалистами NIBSC, ВОЗ и другими регуляторными лабораториями были проведены испытания, подтвердившие, что этот тип мышей может быть использован для тестирования вакцин от полиомиелита. Эти исследования в конечном итоге привели к утверждению нового метода

испытания вакцины на нейровирулентность на мышах¹⁵ [13–15].

Замена методов оценки специфической активности ДА и СА в тестах на животных серологическими методами является продолжением концепции 3Rs, чему уделяется большое внимание во всем мире¹⁶. Например, в Институте сывороток Индии (Serum Institute of India) для оценки специфической активности АКДС-вакцины традиционный метод летального заражения на морских свинках/мышах был заменен методами оценки специфической активности ДА на культуре клеток Vero и СА – методом иммуноферментного анализа (ИФА), которые были разработаны в течение трех лет. Это позволило сократить количество используемых в лабораторных исследованиях морских свинок на 85% (с 232 до 30)¹⁷ [4].

Эксперты ECBS, ЕФ, FDA поддерживают замену теста по определению пирогенности на кроликах на ЛАЛ-тест (реакция лизата амебоцитов с эндотоксином)¹⁸ для идентификации бактериального эндотоксина.

EDQM активно развивает программы¹⁹ по замене и усовершенствованию методов *in vivo* [16]. В период с 2016 по 2022 гг. был организован проект VAC2VAC (Vaccine batch to vaccine batch comparison by consistency testing)²⁰. Целью проекта являлась разработка методов *in vitro* для исследования вакцин, создание процедур и нормативной базы для взаимного принятия вакцин, оценка и оптимизация методов оценки качества вакцин для рутинного контроля. Одно из направлений проекта VAC2VAC было посвящено разработке клеточного метода определения пирогенов – тест активации моноцитов (МАТ), который заменяет не только тест на кроликах, но и ЛАЛ-тест. Метод МАТ позволяет определять все виды пирогенных примесей и обладает высокой чувствительностью (0,004 ЕЭ/мл, ЕЭ – единица эндотоксина) [17]. Эта работа убедила Комиссию ЕФ (The European Pharmacopoeia Commission, EPC) принять решение об исключении метода определения пирогенности

¹³ Diphtheria and tetanus vaccine (adsorbed), version 01/2021:0444. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2024. <https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/accept-methods>

WHO Expert Committee on Biological Standardization: sixty-ninth report. WHO Technical Report Series No. 1016. WHO; 2018. https://nibsc.org/about_us/our_use_of_animals/3rs.aspx

¹⁴ Там же.

Standard operating procedure. Neurovirulence test of types 1, 2 or 3 live attenuated poliomyelitis vaccines (oral) in transgenic mice susceptible to poliovir, version 7. WHO; 2015.

¹⁶ https://www.afsacollaboration.org/sciencex_event/global-workshop-transitioning-dtwp-containing-vaccines-to-animal-free-batch-release-testing-strategy-strategies-for-implementation/

¹⁷ Там же.

¹⁸ <https://www.pei.de/EN/newsroom/hp-news/2024/240718-rabbit-pyrogenest.html>

¹⁹ [https://www.edqm.eu/en/bsp-programme-for-3rs#{%221886723%22:\[\]}\]](https://www.edqm.eu/en/bsp-programme-for-3rs#{%221886723%22:[]}])

²⁰ <https://www.euvaccine.eu/cross-cutting-activities/vac2vac>

<https://www.ih.europa.eu/projects-results/project-factsheets/vac2vac>

на кроликах из монографий ЕФ. С 1 июля 2025 г. метод будет исключен из 57 монографий²¹.

Таким образом, EDQM поощряет применение методов, не связанных с использованием животных. Международное сотрудничество является ключевым элементом для внедрения принципов 3Rs в практику. Для успешного освоения новых методов необходимы не только взаимодействие между производителями и регуляторными органами, но также обмен стандартными процедурами и участие в многоцентровых валидационных исследованиях.

Применение принципов 3Rs в контексте оценки качества АКДС-вакцины

Дифтерийный и столбнячный анатоксины, а также вакцина от коклюша являются компонентами ряда вакцин календаря прививок. АКДС-вакцину производят с 1948 г. [18], а методы производства и контроля качества вакцины эволюционировали вместе с развитием науки и технологий. В настоящее время для контроля качества АКДС-вакцины в мире используются

традиционные методы *in vivo* и альтернативные *in vitro*, которые применяются на разных стадиях производственного цикла при условии, что доказана чувствительность метода *in vitro* относительно метода *in vivo* для частного препарата. Альтернативный метод должен быть одобрен регуляторным органом.

В таблице 2 представлены результаты сравнительного анализа количества лабораторных животных, требуемых для контроля качества вакцины традиционными и современными альтернативными методами на различных стадиях производства.

Традиционными методами оценки специфической безопасности и реверсии токсичности (полнота инактивации токсина) ДА являются кожные тесты. Основанием для замены теста на специфическую безопасность послужили результаты исследования, которые доказали, что чувствительность культуры клеток Vero к дифтерийному токсину выше, чем у животных. Пределы обнаружения токсина *in vitro* зависят от применяемой методики и находятся

Таблица 2. Показатели использования животных для контроля качества АКДС-вакцины традиционными и альтернативными методами на разных стадиях производственного цикла

Table 2. Animal utilization benchmarks for DTP vaccine quality control by traditional and alternative tests across different stages of manufacturing process

Показатель <i>Specification</i>	Количество животных / <i>Number of animals</i>	
	Традиционные методы <i>in vivo</i> ^a <i>Traditional tests in vivo^a</i>	Альтернативные методы ^b <i>Alternative tests</i>
Инактивация токсинов (ДА и СА) и коклюшных микробных клеток <i>Detoxification and purification of toxin (DT and TT), and Bordetella pertussis cells</i>		
Специфическая безопасность (токсичность) ДА и СА <i>Specific toxicity of DT and TT</i>	ДА: 5 МС / <i>DT: 5 GP</i> СА: 5 МС / <i>TT: 5GP</i>	ДА: тест исключен; совмещен с тестом на реверсию токсичности на клетках Vero / <i>DT: test is excluded; it is combined with toxicity reversion Vero cell-based assay</i> СА: 5 МС / <i>TT: 5 GP</i>
Реверсия токсичности ДА и СА <i>Absence of toxin and irreversibility of toxoid DT and TT</i>	ДА: 1–2 МС или 1 кролик <i>DT: 1–2 GP or 1 rabbit</i> СА: 5 МС / <i>TT: 5 GP</i>	ДА: на клетках Vero (совмещен с тестом на специфическую безопасность) / <i>DT: Vero cell-based assay (it is combined with specific toxicity test)</i> СА: тест исключен / <i>TT: test is excluded</i>
Специфическая безопасность Кокл ^{WC, AC} <i>Specific toxicity of pertussis vaccine^{WC, AC}</i>	Тест на увеличение массы тела: 20 мышей ^{WC} ; или тест на термолabile токсин (дермонекротический токсин) ^{WC, AC} ; 3 мыши-сосунки или 2 кролика; гистамин-сенсibilизирующий фактор ^{WC} (20 мышей) <i>Mouse weight-gain test: 20 mice; or heat-labile toxin (dermonecrotic toxin)^{WC, AC}; 3 suckling mice or 2 rabbits; histamine sensitizing activity^{WC} (20 mice)</i>	Кокл* / <i>Pertussis vaccine*</i> Определение активности коклюшного токсина на клетках CHO ^{AC} <i>Determination of active pertussis toxin by utilizing CHO cell clustering assay^{AC}</i>
Суммарное количество используемых животных <i>Total number of animals used</i>	16–18 МС, 1–3 кролика, 43 мыши <i>16–18 GP, 1–3 rabbits, 43 mice</i>	5 МС / <i>5 GP</i>

²¹ https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-reflection-paper-current-regulatory-testing-requirements-medicinal-products-human-use-opportunities-implementation-3rs-revision-1_en.pdf

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

Показатель <i>Specification</i>	Количество животных / <i>Number of animals</i>	
	Традиционные методы <i>in vivo</i> ^a <i>Traditional tests in vivo^a</i>	Альтернативные методы ^b <i>Alternative tests</i>
Получение адсорбированных компонентов вакцины (до розлива) / <i>Control of final bulk (before filling)</i>		
Специфическая безопасность (ДА, СА, Кокл ^{WC, AC}) <i>Specific toxicity (DT, TT, Pv^{WC, AC})</i>	ДА: 5 MC / <i>DT: 5 GP</i> ; СА: 5 MC / <i>TT: 5 GP</i> Кокл: тест на увеличение массы тела: 20 мышей ^{WC} ; тест на термолabile токсин (дермонекротический токсин) ^{WC, AC} : 3 мыши-сосунки или 2 кролика, или гистамин-сенситизирующий фактор ^{WC} (20 мышей) <i>Pv: mouse weight-gain test^{WC} (20 mice); heat-labile toxin^{WC, AC} (dermonecrotic toxin): 3 suckling mice or 2 rabbits; or histamine sensitizing activity^{WC} (20 mice)</i>	ДА: тест исключен / <i>DT: test is excluded</i> СА: тест исключен / <i>TT: test is excluded</i> Кокл* / <i>Pv*</i>
Специфическая активность (ДА, СА, Кокл ^{WC, AC}) <i>Potency (DT, TT, P^{WC, AC})</i>	ДА: 64–75 MC / <i>DT: 64–75 GP</i> СА: 64–112 мышей или 76 MC <i>TT: 64–112 mice or 76 GP</i> Кокл ^{WC} : 210–260 мышей (метод Кендрик) <i>Pv^{WC}: 210–260 mice (Kendrick test)</i>	ДА: 64–75 MC / <i>DT: 64–75 GP</i> СА: 64–112 мышей или 76 MC <i>TT: 64–112 mice or 76 GP</i> Кокл*, 30–100 мышей ^{AC} (ИФА) <i>Pv*, 30–100 mice^{AC} (ELISA)</i>
Суммарное количество используемых животных <i>Total number of animals used</i>	150–161 MC, 317–415 мышей, 2 кролика (опционально) <i>150–161 GP, 317–415 mice, 2 rabbits (optional)</i>	64–151 MC, 94–212 мышей <i>64–151 GP, 94–212 mice</i>
Контрольные испытания готового продукта (после розлива) / <i>Control of final product (after filling)</i>		
Специфическая безопасность (ДА, СА, Кокл ^{WC}) <i>Specific toxicity (DT, TT, Pv^{WC})</i> Аномальная токсичность (ДА, СА) <i>Abnormal toxicity (DT, TT)</i>	ДА, СА: 5 MC, Кокл ^{WC} : 20 мышей <i>DT, TT: 5 GP, Pv^{WC}: 20 mice</i> ДА, СА: 2 MC, 5 мышей / <i>DT, TT: 2 GP, 5 mice</i>	Кокл* / <i>Pv*</i> Тесты исключены для всех компонентов вакцины <i>Tests are excluded for all components of vaccine</i>
Специфическая активность (ДА, СА, Кокл) <i>Potency (DT, TT, Pv)</i>	ДА: 64–75 MC / <i>DT: 64–75 GP</i> СА: 64–112 мышей или 76 MC <i>TT: 64–112 mice or 76 GP</i> Кокл ^{WC} : 200–250 мышей <i>Pv^{WC}: 200–250 mice</i>	ДА: 20–75 MC, СА: 64–112 мышей или 20–116 MC, Кокл*, 30–100 мышей ^{AC} (ИФА) <i>DT: 20–75 GP, TT: 64–112 mice or 20–116 GP, Pv*: 30–100 mice^{AC} (ELISA)</i>
Суммарное количество используемых животных <i>Total number of animals used</i>	71–158 MC, 299–397 мышей <i>71–158 GP, 299–397 mice</i>	40–191 MC, 94–212 мышей <i>40–191 GP, 91–112 mice</i>
Суммарное количество используемых животных (включая все стадии производства вакцины) <i>Total number of animals used (included all manufacturing stages)</i>	237–337 MC, 659–855 мышей, 3 кролика <i>237–337 GP, 659–855 mice, 3 rabbits</i>	104–324 MC, 188–424 мышей <i>104–324 GP, 188–424 mice</i>

Таблица составлена авторами с использованием источников^{a, b} / *The table is prepared by the authors using data from the sources^{a, b}*

Примечание. ДА – дифтерийный анатоксин; СА – столбнячный анатоксин; Кокл – коклюшный компонент; ЕФ – Европейская фармакопея; MC – морские свинки; ИФА – иммуноферментный анализ, * – не применимо для цельноклеточной коклюшной вакцины; Кокл^{WC} – для цельноклеточной коклюшной вакцины; Кокл^{AC} – для бесклеточной (ацеллюлярной) коклюшной вакцины. *Note.* DT, diphtheria toxoid; TT, tetanus toxoid; Pv, pertussis vaccine; EF, European Pharmacopoeia; GP, guinea pig; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; *, not applicable for whole cell pertussis vaccine; Pv^{WC}, for whole cell pertussis vaccine; Pv^{AC}, for acellular pertussis vaccine.

^a WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 17th report: WHO TRS No. 800. WHO; 1990.

^b Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines, Diphtheria and Tetanus vaccine (adsorbed), version 01/2021:0444. Ph. Eur. 11th ed. Strasbourg, France: Council of Europe; 2013.

в диапазоне от 10 до 100 пг/мл, что на порядок выше предела обнаружения метода *in vivo* [19]. Поскольку для определения реверсии токсичности должны применяться высокочувствительные методы, позволяющие обнаруживать очень малые количества токсина, то оба теста объединили.

Тест на реверсию токсичности СА был исключен. Это решение было основано на данных о стабильности СА. За долгую мировую практику производства ни разу не было зафиксировано реверсии токсичных свойств.

После сорбции ДА и СА на адъювант (гель алюминия) испытания на специфическую

безопасность считаются избыточными, поэтому они были исключены как на данной стадии производства, так и в готовом продукте.

Эксперты EDQM инициировали исследования по оценке альтернативного серологического испытания цельноклеточного коклюшного компонента с целью замены метода определения специфической активности *in vivo*. Используемый метод основан на интрацеребральном введении летальных доз тест-штамма *Bordetella pertussis* (метод Кендрик). Исследования были прекращены²², так как анализ полученных результатов не продемонстрировал достаточной точности и воспроизводимости.

Для контроля качества бесклеточных коклюшных вакцин²³ на стадии получения антигенов и их сорбции на адъювант применяются в основном иммунохимические методы (ракетный электрофорез, радиальная иммунодиффузия), ЛАЛ-тест и высокоэффективная жидкостная хроматография. Для оценки остаточных количеств коклюшного токсина и реверсии токсичности коклюшного анатоксина (в таблице 2 обозначен как тест на специфическую безопасность) был применен тест на гистамин-сенсibiliзирующий фактор. С 2020 г. он был заменен²⁴ на тест *in vitro* с использованием культуры клеток CHO²⁵ (CHO cell clustering assay). В готовой вакцине контроль специфической безопасности не предусмотрен.

Специфическую активность каждого компонента вакцины контролируют на нескольких стадиях производственного цикла: до розлива, на стадии готового продукта после розлива, а также при лицензировании/выпуске серии вакцины. Комитетом экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов установлены требования к показателю специфической активности этих анатоксинов в прививочной дозе (0,5 мл): ≥ 30 МЕ для ДА, ≥ 40 МЕ (в тесте на мышах 60 МЕ) для СА²⁶ и 4 МЕ – для цельноклеточного коклюшного компонента²⁷. Для бесклеточных коклюшных компонентов международных норм не установлено, специфическую активность оценивают методом ИФА.

Большее количество животных (табл. 2) требуется для испытаний традиционными методами *in vivo*. Для оценки безопасности и токсичности компонентов вакцины внедрение альтернативных методов позволило практически полностью

сократить количество животных в эксперименте. Для определения специфической активности ДА и СА количество животных не стало меньше: от 64 до 75 морских свинок (ДА) и 64–112 мышей или 76 морских свинок (СА). Количество и вид животных зависят от методики оценки, принятой в стране-производителе вакцины. Несмотря на активное внедрение альтернативных методов для определения специфической активности в практику производителей, значительного сокращения количества животных в эксперименте не достигнуто. Поскольку основным принципом применения концепции 3Rs является снижение страданий животных, а именно использование ГКТ, некоторые производители сократили количество используемых животных на стадии готового продукта путем применения метода однодозовых разведений для оценки специфической активности ДА и СА. Существенно сократить количество экспериментальных животных удалось в случае производства вакцины, содержащей бесклеточный коклюшный компонент: при помощи метода ИФА в образцах сыворотки крови мышей определяют титр антител к каждому антигену, присутствующему в вакцине.

Таким образом, большее количество животных необходимо для оценки специфической активности. Поэтому практический интерес для исследователей представляет анализ основных различий между альтернативными методами и традиционными методами «золотого стандарта». Далее будут проанализированы методы оценки специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов в АКДС-вакцине.

Оценка специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов

Специфическую активность ДА и СА в вакцинах определяют путем сравнения с соответствующей референс-вакциной, откалиброванной по международному стандарту. Методы, которые применяют для контроля качества вакцины, можно разделить на две группы²⁸: методы с введением токсинов животным и серологические методы с определением титра специфических антител (рис. 1).

Каждый метод включает в себя два этапа: иммунизация, затем либо введение провокационных доз токсина, либо забор крови у животного

²² <https://www.edqm.eu/en/-/update-on-bsp-study-on-the-evaluation-of-a-replacement-method-for-the-potency-control-of-whole-cell-pertussis-vaccines>

²³ WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series No. 979. WHO; 2013.

²⁴ <https://www.edqm.eu/en/-/ph-eur-to-replace-histamine-sensitisation-test-hist-for-residual-pertussis-toxin-testing>

²⁵ CHO, Chinese hamster ovary cells (клетки яичника китайского хомячка).

²⁶ WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 17th report: TRS No. 800. WHO; 1990.

²⁷ Там же.

²⁸ Chapters 2.7.6 and 2.7.8. European Pharmacopoeia. 11th ed. Vol. 1. Strasbourg: EDQM; 2024.

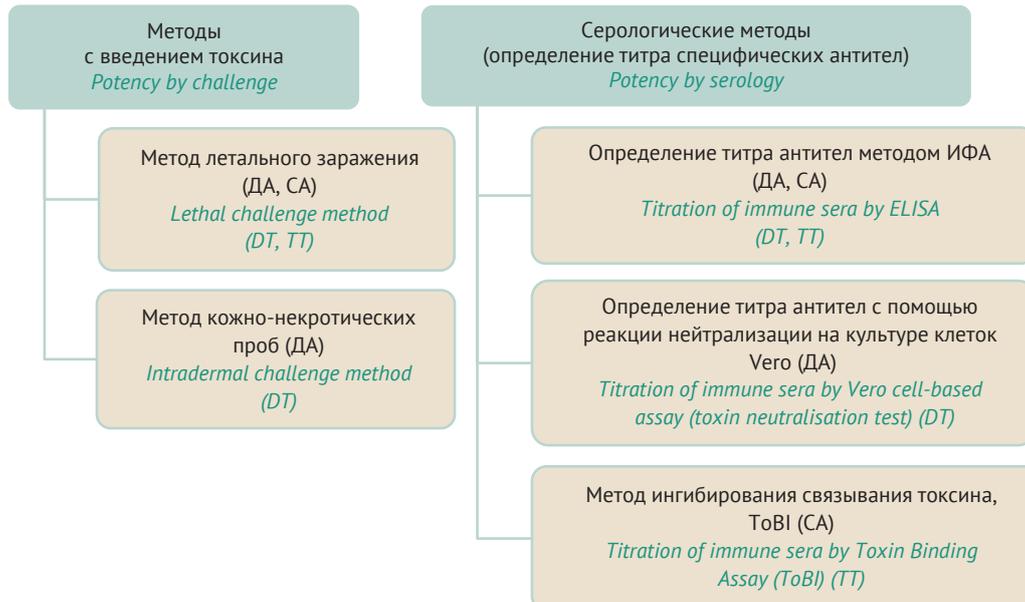


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 1. Методы определения специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов.

Fig 1. Tests for diphtheria and tetanus toxoids (adsorbed) potency assessment.

Примечание. ДА – дифтерийный анатоксин; СА – столбнячный анатоксин; ИФА – иммуноферментный анализ; ToBI – метод ингибирования связывания токсина.

Note. DT, diphtheria toxoid; TT, tetanus toxoid; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; ToBI, toxin binding assay.

для последующего определения уровня антител. Поскольку методы летального заражения являются «золотым стандартом» то все альтернативные методы должны быть валидированы относительно них²⁹. Для подтверждения корреляции показателей иммунного ответа (специфическая активность), определяемых по выживаемости при летальном заражении животных, и результатами серологических методов требуется параллельное изучение иммунного ответа двумя способами. При этом необходимо отметить, что требования к количественному значению показателя иммунного ответа, определяемого серологическим методом, не установлены.

Методами летального заражения специфическую активность СА и ДА определяют по их способности защищать иммунизированных животных от заражения соответствующим токсином и выражают в количестве Международных единиц (МЕ) активности, содержащихся в 1 мл или в прививочной дозе (0,5 мл).

Метод кожно-некротических проб, несмотря на введение токсина морским свинкам, считается соответствующим принципам 3Rs, поскольку животные не гибнут от дифтерийной интоксикации. В данном методе появление эритемы или некроза после внутрикожного введения

токсина служит в качестве ГКТ, что минимизирует страдания животных. В ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России проводили работы по валидации метода кожно-некротических проб и было установлено, что его использование в рутинной практике сопряжено с рисками получения недостоверных результатов в сравнении с методом летального заражения [20].

Методы определения специфической активности применяют главным образом в двух вариантах: а) испытание с тремя разведениями позволяет определить количество единиц активности в прививочной дозе препарата; б) испытание с одним разведением позволяет провести сравнительную оценку активности прививочной дозы и референс-вакцины. Активность испытуемой вакцины считается удовлетворительной, если ее введение в организм вызывает значительно более высокий уровень ответа, чем референс-вакцина (точный критерий Фишера односторонний, $p \leq 0,05$). Из всех описанных выше методов только метод кожно-некротических проб не может быть выполнен с одним разведением.

Многие сторонники альтернативных серологических методов [4, 21–23] отмечают, что факторами, побуждающими отказаться

²⁹ Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

от традиционных методов с введением токсинов, являются длительность и сложность их постановки, потребность в большом количестве животных разных видов, вариабельность результатов из-за нестандартности животных, необходимость работы с патогенным материалом при заражении животных, а также тщательного соблюдения норм биоэтики при работе с лабораторными животными. В связи с этим задача максимального сокращения использования животных для оценки биологических препаратов

важна не только по этическим соображениям, но научно и практически обоснована: животные дорогостоящи и не могут быть стандартизованы.

Ниже изложены результаты сравнительной оценки альтернативных методов и методов летального заражения для определения специфической активности ДА и СА по количеству животных, материальным и временным затратам и затратам прочих ресурсов (табл. 3 и табл. S1, опубликована на сайте журнала³⁰). Все рассматриваемые методы являются фармакопейными³¹.

Таблица 3. Сравнение метода летального заражения с серологическими методами определения специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов

Table 3. Comparison of the lethal challenge test with serological tests for potency assessment for diphtheria and tetanus toxoids

Ресурсы ^a <i>Resources^a</i>	Метод летального заражения <i>Lethal challenge method</i>	Серологические методы / <i>Serological tests</i>		
		ИФА <i>ELISA</i>	На культуре клеток Vero <i>Vero cell-based assay</i>	ToBI
Количество животных: <i>Number of animals:</i> Дифтерийный анатоксин <i>Diphtheria toxoid</i>	75–87 / 25 ^b MC <i>75–87 / 25^b GP</i>	70 / 25–30 ^b MC <i>75–87 / 25–30^b GP</i>	70 / 25–30 ^b MC <i>75–87 / 25–30^b GP</i>	Не применимо <i>Not applicable</i>
Столбнячный анатоксин <i>Tetanus toxoid</i>	75–87 / 25 ^b MC или 112 / 48 ^b мышей <i>75–87 / 25^b GP or 112 / 48^b mice</i>		Не применимо <i>Not applicable</i>	70 / 25–30 ^b MC <i>75–87 / 25–30^b GP</i>
Количество этапов <i>Number of stages</i>	2	4	4	4
Длительность испытания <i>Duration of the test</i>	32–35 сут <i>32–35 days</i>	40–50 сут <i>40–50 days</i>	40–50 сут <i>40–50 days</i>	40–50 сут <i>40–50 days</i>
Расчет специфической активности <i>Calculation of potency values</i>	Не требует дополнительной обработки первичных данных <i>Additional processing of raw data is required</i>	Требуется дополнительная обработка первичных данных <i>Additional processing of raw data is not required</i>		
Лабораторные отходы <i>Laboratory waste</i>	Обеззараживание и утилизация: / <i>Disinfection and utilization:</i>			
	Наконечники для дозаторов, шприцы, иглы <i>Tips, syringes, needles</i>	Наконечники для дозаторов, шприцы, иглы, пробирки для крови и сыворотки крови, микропланшеты и другой лабораторный пластик; утилизация растворов <i>Tips, syringes, needles, blood and serum test tubes, microplates and other laboratory plastics; disposal of liquid wastes</i>		
	Утилизация животных / <i>Disposal of animal carcasses</i>			

Таблица подготовлена авторами с использованием источников согласно сноске^c, указанной в примечании / *The table is prepared by the authors using data from the sources specified in the footnote^c shown in the notes*

Примечание. MC – морские свинки; ИФА – иммуноферментный анализ; ToBI – метод ингибирования связывания токсина.

^a Подробная информация о содержании этапов исследований, критических реактивах и стандартах, вспомогательных реактивах, дополнительных материалах, оборудовании, особых навыках персонала, расчете показателей специфической активности размещена в *таблице S1* на сайте журнала.

^b Метод с тремя разведениями / метод с одним разведением препарата.

^c Руководство по контролю качества вакцин против дифтерии, столбняка, коклюша. ВОЗ; 2013.

^d Notes. GP, guinea pig; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ToBI, toxin binding assay.

^e Detailed information about the stages of tests, critical reagents and standards, other reagents, additional materials, equipment, special skills of personal, calculation of potency values are shown in *table S1* deposited on the journal website.

^f Three-dilution test / one-dilution test of a preparation.

^g Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines. WHO; 2013.

³⁰ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-156-169-table-s1>

³¹ Chapters 2.7.6 and 2.7.8. European Pharmacopoeia. 11th ed. Vol. 1. Strasbourg: EDQM; 2024.

ФС.3.3.1.0010.15 Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная (АКДС-вакцина). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд; 2016.

ОБСУЖДЕНИЕ

В российской практике внедрение принципов 3Rs осуществлено введением в 2010 г. в метод летального заражения методики с одним разведением в соответствии с требованиями ЕФ и ВОЗ. Это позволило значительно сократить количество животных, используемых в тестах специфической активности ДА и СА, — с 75 до 25 морских свинок и с 108 до 48 мышей соответственно.

Зарубежные авторы, обсуждая альтернативные методы тестирования специфической активности АКДС-вакцины, отмечают их значительные преимущества перед традиционными методами: высокую точность, экономичность и, самое важное, — сокращение количества используемых животных [21–23].

Основываясь на результатах анализа данных, представленных в *таблицах 3 и S1*, можно рассмотреть, насколько принципы 3Rs реализованы в альтернативных методах оценки специфической активности ДА и СА.

Замена: сравнительная оценка методов определения специфической активности дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины показывает, что основными методами контроля остаются методы *in vivo*. Постановка альтернативных методов требует использования животных, что, в свою очередь, не дает дополнительных преимуществ с точки зрения сокращения продолжительности испытаний и количества животных в испытании.

Сокращение: для вакцин, содержащих ДА и СА, принцип реализуется в испытаниях с одним разведением.

Усовершенствование: использование гуманных конечных точек. В серологических методах — это неклиническая конечная точка, в которой производят забор крови под инъекционным наркозом для определения титра защитных антител, после чего гуманно умерщвляют животное. Таким образом, исключается стадия заражения токсином, который провоцирует клиническую картину дифтерии или столбняка, где конечной точкой является смерть или тяжелые клинические проявления в виде паралича вследствие столбнячной интоксикации.

Проведенный анализ демонстрирует, что все альтернативные серологические методы требуют большего количества дорогостоящих стандартных образцов, дополнительных реактивов, специального дорогостоящего оборудования, особенно для теста с использованием клеточной культуры, и программного обеспечения по сравнению с методом «золотого стандарта». Необходимо также учитывать, что постановка технически сложных методов требует

наличия персонала, обладающего определенными навыками и компетенциями для забора крови из сердца (или *vena saphena*), пробоподготовки образцов крови, постановки ИФА и МТТ-теста, работы с клеточной культурой и навыками статистической обработки данных. Многоэтапность альтернативных методов может повлечь за собой появление множественных ошибок. Например, выполнение теста на клеточной культуре связано не только с дополнительными финансовыми затратами, но и серьезными рисками: во-первых, все манипуляции необходимо проводить в асептических условиях; во-вторых, непосредственно перед каждым испытанием необходимо определять цитопатическую дозу дифтерийного токсина, потому что клеточная культура от серии к серии обладает значительной вариативной чувствительностью к токсину; в-третьих, для работы с клеточными культурами сотрудники должны обладать специальными навыками.

Таким образом, тезисы зарубежных авторов [21–23] о том, что испытания на животных являются более дорогими, трудоемкими и изменчивыми по сравнению с альтернативными, не подтверждаются. Ни один из рассмотренных альтернативных методов не уступает методу «золотого стандарта» по количеству животных, длительности испытания и экономичности. Только в методе ИФА исключена работа с токсинами и оптимизировано количество животных в эксперименте. ИФА позволяет одновременно оценить иммунный ответ к столбнячному и дифтерийному антигенам в образце сыворотки крови, взятого от одного животного.

Принципы 3Rs распространяются на все сферы жизнедеятельности современного человека, в том числе и на защиту окружающей среды от загрязнений. В последнее время научное сообщество активно обсуждает вопрос о необходимости снижения объема отходов лабораторного пластика. Среди основных предлагаемых стратегий — замена пластиковых лабораторных материалов (посуда, пипетки и др.) на металлические или стеклянные, вторичное использование после обработки (дезинфекция, мойка) и сокращение применения одноразового пластика в том случае, если не применимы первые две стратегии. Если исследования не позволяют отказаться от одноразовых пластиковых материалов, их следует сортировать и сдавать для переработки. Исследователи отмечают, что, хотя переработка и/или утилизация и создает загрязнение окружающей среды, это предпочтительнее, чем после

дезинфекционной обработки утилизировать пластиковые материалы как отходы³².

Анализ методов с точки зрения количества получаемых лабораторных отходов показал, что несомненными преимуществами обладают методы летального заражения: минимальное количество лабораторного пластика (шприцы, наконечники для дозаторов), возможность использовать стеклянные флаконы и серологические стеклянные пипетки для приготовления разведений, а животные утилизируются с органическим остатком. Для альтернативных методов применение стратегий снижения лабораторных отходов представляется затруднительным ввиду необходимости использования микропланшетов для ИФА, культуральных планшетов и других одноразовых материалов. Эти методы, особенно метод с использованием культуры клеток, предполагают применение некоторого количества токсичных растворов, на обеззараживание и утилизацию которых необходимы дополнительные ресурсы.

Из приведенного выше анализа современных альтернативных методов определения специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов в АКДС-вакцине выявлены преимущества и недостатки. Так, метод ИФА имеет несомненные преимущества: позволяет сократить количество животных в эксперименте благодаря возможному определению антител к двум антигенам в образцах крови, взятых от одного животного; не используются токсины; не требуются особые лабораторные условия для выполнения анализа; дешевле относительно других альтернативных методов.

Методы с использованием клеточной культуры Vero и метод ингибирования связывания токсина (ToBI) имеют ряд существенных недостатков по сравнению с ИФА: длительность и сложность постановки, необходимость работы с токсинами.

Из недостатков трех рассмотренных альтернативных методов можно выделить следующие: необходимость приобретения значительного количества критических реагентов и стандартных образцов, специального оборудования и программного обеспечения; наличие персонала, обладающего специальными навыками и компетенциями; утилизация большого объема лабораторных отходов классов Б и Г.

Проведенный анализ современных методов определения специфической активности компонентов АКДС-вакцины позволяет заключить, что с помощью метода летального заражения («золотой стандарт») можно быстрее и с меньшей

трудоемкостью оценить протективные свойства вакцины по сравнению с альтернативными методами. Таким образом, серологические методы для определения специфической активности компонентов АКДС-вакцины можно рассматривать как более трудоемкие, длительные по времени и требующие вовлечения большего числа специалистов.

В то же время нельзя не отметить преимущества альтернативных методов, применяющихся в процессе производственного цикла, для оценки реверсии токсичности и безопасности АКДС-вакцины. Замена контроля на более чувствительные к дифтерийному токсину культуры клеток Vero и отказ от тестирования СА значительно упрощают процедуры и ведут к сокращению количества лабораторных животных в исследованиях.

Для внедрения в российскую производственную и лабораторную практику новых методов необходимо проведение их валидации при активном сотрудничестве исследовательских лабораторий, производителей и государственных регуляторных органов. В настоящее время продолжаются исследования по использованию ИФА для контроля качества АКДС-вакцины [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По сравнению с альтернативными методами определения специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов в АКДС-вакцине методы летального заражения являются самыми быстрыми и простыми в исполнении, не требуют дополнительного оборудования, программного обеспечения, критических стандартных образцов, реагентов и материалов, а также особых навыков персонала лаборатории.

При выборе альтернативных методов, ИФА — наиболее предпочтителен вследствие его экономичности, наименьшей сложности в исполнении и отсутствия необходимости использовать токсины в анализе. ИФА оптимален при изучении влияния антигенного состава комбинированных вакцин на специфическую активность отдельных антигенов, поскольку в образцах крови иммунизированного животного можно одновременно определять титры антител различной специфичности. Несомненно, подобное объединение процедур контроля специфической активности комбинированных вакцин на основе АКДС в одном серологическом тесте приведет к значительному сокращению количества животных в экспериментах.

³² <https://hellobio.com/blog/ten-ways-to-reduce-plastic-waste-in-the-lab.html>
<https://lms.mrc.ac.uk/top-tips-to-make-your-lab-more-sustainable/>
<https://www.sustainable.pitt.edu/reducing-lab-plastics/>

Литература/References

1. Stickings P, Rigsby P, Coombes L, Hockley J, Tierney R, Sesardic D. Animal refinement and reduction: alternative approaches for potency testing of diphtheria and tetanus vaccines. *Procedia Vaccinol.* 2011;(5):200–12. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.020>
2. Tannenbaum J, Taylor Bennett B, Russell and Burch's 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54(2):120–32. PMID: PMC4382615
3. Hubrecht RC, Carter E. The 3Rs and humane experimental technique: Implementing change. *Animals.* 2019;9(10):754. <https://doi.org/10.3390/ani9100754>
4. Akkermans A, Chapsal JM, Coccia EM, Depraetere H, Dierick JF, Duangkhae P, et al. Animal testing for vaccines. Implementing replacement, reduction and refinement: challenges and priorities. *Biologicals.* 2020;68:92–107. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.07.010>
5. Lilley E, Coppens E, Das P, Galaway F, Isbrucker R, Sheridan S, et al. Integrating 3Rs approaches in WHO guidelines for the batch release testing of biologicals: Responses from a survey of vaccines and biological therapeutics manufacturers. *Biologicals.* 2023;81:101660. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2022.11.002>
6. Hendriksen C, Arciniaga JL, Bruckner L, Chevalier M, Coppens E, Descamps J, et al. The consistency approach for the quality control of vaccines. *Biologicals.* 2008;36:73–7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2007.05.002>
7. Uhlrich S, Coppens E, Moysan F, Nelson S, Nougarede N. 3Rs in quality control of human vaccines: opportunities and barriers. In: Kojima H, Seidle T, Spielmann H, eds. *Alternatives to animal testing.* Springer Singapore; 2019. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2447-5_10
8. Hendriksen CFM, Steen B. Refinement of vaccine potency testing with the use of humane endpoints. *ILAR J.* 2000;41(2):105–13. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.2.105>
9. Stokes WS. Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. *ILAR J.* 2002;43 Suppl:S31–8. PMID: 12388849
10. Неугодова НР, Степанюк ЕО, Сапожникова ГА, Саканян ЕИ, Рябцева МС. Современные подходы к введению показателя «Аномальная токсичность». *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2020;10(2):82–8. Neugodova NP, Stepanyuk EO, Sapozhnikova GA, Sakanyan EI, Ryabtseva MS. Current approaches to the abnormal toxicity test. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2020;10(2):82–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-82-88>
11. Nomoto A. Molecular aspects of poliovirus pathogenesis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2007;83(8):266–75. <https://doi.org/10.2183/pjab.83.266>
12. Racaniello VR. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology.* 2006;344(1):9–16. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.015>
13. Koike S, Nagata N. A transgenic mouse model of poliomyelitis. *Methods Mol Biol.* 2016;1387:129–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3292-4_7
14. Fulton MC, Bailey WJ. Live viral vaccine neurovirulence screening: Current and future models. *Vaccines (Basel).* 2021;9(7):710. <https://doi.org/10.3390/vaccines9070710>
15. Rubin SA. Toward replacement of the monkey neurovirulence test in vaccine safety testing. *Procedia Vaccinol.* 2011;5:261–5. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.027>
16. Zhang X, Wu X, He Q, Wang J, Mao Q, Liang Z, Xu M. Research progress on substitution of *in vivo* method(s) by *in vitro* method(s) for human vaccine potency assays. *Expert Rev Vaccines.* 2023;22(1):270–7. <https://doi.org/10.1080/14760584.2023.2178421>
17. Solati S, Zhang T, Timman S. The monocyte activation test detects potentiated cytokine release resulting from the synergistic effect of endotoxin and non-endotoxin pyrogens. *Innate Immun.* 2022;28(3–4):130–7. <https://doi.org/10.1177/17534259221097948>
18. Decker MD, Edwards KM, Howe BJ. Combination vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM, eds. *Plotkin's Vaccines.* 7th ed. Philadelphia PA: Elsevier; 2018. P. 198–227.
19. Prygiel M, Mosiej E, Polak M, Krysztopa-Grzybowska K, Wdowiak K, Formińska K, Zasada AA. Challenges of diphtheria toxin detection. *Toxins (Basel).* 2024;16(6):245. <https://doi.org/10.3390/toxins16060245>
20. Комаровская ЕИ, Перельгина ОВ. Определение специфической активности дифтерийного анатоксина в комбинированных вакцинах методом кожно-некротических проб. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2023;22(4):12–23. Komarovskaya EI, Perelygina OV. Assay of diphtheria vaccine potency by intradermal challenge test. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2023;22(4):12–23 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2023-22-4-12-23>
21. Gupta RK, Anderson R, Cecchini D, Rost B, Xu J, Gendreau K, et al. Evaluation of a guinea pig model to assess interference in the immunogenicity of different components of a combination vaccine comprising diphtheria, tetanus and acellular pertussis (DTaP) vaccine and *haemophilus influenzae* type B capsular polysaccharide conjugate vaccine. *Biologicals.* 1999;27(2):167–76. <https://doi.org/10.1006/biol.1999.0204>
22. Stalpers CAL, Retmana IA, Pennings JLA, Vandebriel RJ, Hendriksen CFM, Akkermans AM, et al. Variability of *in vivo* potency tests of diphtheria, tetanus and acellular pertussis (DTaP) vaccines. *Vaccine.* 2021;39(18):2506–16. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.078>
23. Szeto J, Beharry A, Chen T, Zholumbetov E, Daigneault E, Ming M, et al. Development of an *in vitro* test method to replace an animal-based potency test for pertactin antigen in multivalent vaccines. *Vaccines.* 2023;11(2):275. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020275>
24. Комаровская ЕИ, Солдатов АА. Изучение иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам серологическим методом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(3):321–32. Komarovskaya EI, Soldatov AA. Evaluation of the immune response to diphtheria and tetanus toxoids by the serological methods. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2023;23(3):321–32 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-321-332>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещена [таблица S1](https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-156-169-table-s1).

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.И. Комаровская** — идея исследования, обработка и анализ данных литературы, написание текста рукописи, формулировка выводов исследования; **О.В. Проскурина** — оформление таблиц, работа с источниками литературы.

Additional information. *Table S1* is published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.*

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.I. Komarovskaya** conceived the study idea, drafted the manuscript, and formulated the conclusions; **O.V. Proskurina** designed the tables, collected and analysed literature data.

Об авторах / Authors

Комаровская Елена Игоревна / Elena I. Komarovskaya
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9035-6072>

Проскурина Ольга Владимировна / Olga V. Proskurina
ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-1937-4946>

Поступила 31.10.2024

После доработки 19.05.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Received 31 October 2024

Revised 19 May 2025

Accepted 6 June 2025



Лекарственные препараты иммуноглобулина человека против гепатита В: вопросы стандартизации

Е.А. Коновалова , Е.Н. Калинина, Е.С. Кормщикова, Е.В. Росина, С.Е. Зиганшина, К.А. Воробьев, И.В. Парамонов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», ул. Красноармейская, д. 72, Киров, 610027, Российская Федерация

 Коновалова Екатерина Анатольевна; konovalovaea@niigpk.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Специфический иммуноглобулин человека получают из плазмы крови иммунизированных доноров и применяют для иммунопрофилактики вирусного гепатита В. Основная проблема при контроле качества таких препаратов и оценке их профилактической эффективности связана с отсутствием стандартных образцов, аттестованных по содержанию антител к поверхностному антигену вируса гепатита В. Систематизация и анализ существующего лабораторного и производственного опыта в данной области нужны для выработки новых подходов к стандартизации препаратов иммуноглобулина человека против гепатита В.

ЦЕЛЬ. Охарактеризовать лекарственные препараты иммуноглобулина человека против гепатита В и рассмотреть подходы к их стандартизации.

ОБСУЖДЕНИЕ. Большая часть препаратов иммуноглобулина человека против гепатита В разработана в Германии (27%), Италии (17%) и США (17%). Из всех препаратов 67% выпускается в лекарственной форме для внутримышечного введения, 30% – для внутривенного введения, 3% – для подкожного введения. Специфическая активность указанных лекарственных средств варьирует от 50 до 500 МЕ/мл. В России зарегистрировано три наименования препарата, содержащего специфический иммуноглобулин человека. Количество вводимых в гражданский оборот лекарственных средств не в полной мере покрывает потребности лечебно-профилактических учреждений. Эффективность иммунопрофилактики напрямую зависит от дозы препарата, которую рассчитывают исходя из специфической активности. Для обеспечения точности определения указанного показателя качества следует использовать стандартный образец содержания антител к поверхностному антигену вируса гепатита В, аттестованный в международных единицах. Существующий международный стандарт специфического иммуноглобулина человека ограниченно доступен для приобретения на территории Российской Федерации, а национальный (фармакопейный) стандартный образец отсутствует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Анализ данных о выпускаемых препаратах иммуноглобулина человека против гепатита В позволил выявить современные направления развития данной сферы фарминдустрии. Разработка и применение национального (фармакопейного) стандартного образца содержания антител к поверхностному антигену вируса гепатита В будет способствовать повышению качества продукции и эффективности иммунопрофилактики.

Ключевые слова: вирусный гепатит В; антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В; иммуноглобулин человека против гепатита В; специфическая активность; стандартный образец

Для цитирования: Коновалова Е.А., Калинина Е.Н., Кормщикова Е.С., Росина Е.В., Зиганшина С.Е., Воробьев К.А., Парамонов И.В. Лекарственные препараты иммуноглобулина человека против гепатита В: вопросы стандартизации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(2):170–181. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-621>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФМБА России на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124032600075-0).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Human hepatitis B immunoglobulins: Standardisation issues

Ekaterina A. Konovalova , Elena N. Kalinina, Elena S. Kormshchikova, Elena V. Rosina, Svetlana E. Ziganshina, Konstantin A. Vorobiev, Igor V. Paramonov

Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency, 72 Krasnoarmeyskaya St., Kirov 610027, Russian Federation

 Ekaterina A. Konovalova; konovalovaea@niigpk.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Human hepatitis B immunoglobulins (HBIGs) are produced from the plasma of vaccinated donors and are used to prevent hepatitis B virus infection. The main challenge associated with the quality control and efficacy evaluation of HBIGs is the lack of reference standards certified for the content of antibodies to hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). Systematisation and analysis of the relevant experience in HBIG testing and manufacturing will contribute to the development of new approaches to HBIG standardisation.

AIM. This study aimed to characterise HBIGs and consider approaches to their standardisation.

DISCUSSION. Most HBIGs are developed in Germany (27%), Italy (17%), and the USA (17%) and are formulated for intramuscular (67%), intravenous (30%), and subcutaneous (3%) administration. The potency of HBIGs varies from 50 to 500 IU/mL. There are 3 HBIGs approved in Russia, but the available HBIGs do not fully cover the needs of prevention and treatment providers. The effectiveness of hepatitis B prevention directly depends on the HBIG dose, which is calculated using the potency of the HBIG. Ensuring the accuracy of HBIG potency determination requires a reference standard for anti-HBsAg antibodies certified in international units. The existing international standard for HBIGs has limited commercial availability in the Russian Federation, and the national (pharmacopoeial) reference standard for HBIGs is lacking.

CONCLUSIONS. The analysis of information on the currently manufactured HBIGs has identified recent development trends in this pharmaceutical industry sector. The future development and implementation of the national (pharmacopoeial) reference standard for anti-HBsAg antibodies will contribute to improving the quality of HBIGs and, therefore, the effectiveness of preventive immunisation against hepatitis B.

Keywords: viral hepatitis B; HBV; antibodies to hepatitis B virus surface antigen; HBsAg; human hepatitis B immunoglobulin; potency; reference standard

For citation: Konovalova E.A., Kalinina E.N., Kormshchikova E.S., Rosina E.V., Ziganshina S.E., Vorobiev K.A., Paramonov I.V. Human hepatitis B immunoglobulins: Standardisation issues. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(2):170–181. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-621>

Funding. This study was conducted as part of applied research funded under a state assignment of the Federal Medical Biological Agency of Russia (R&D Registry No. 124032600075-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусный гепатит В (ВГВ) – инфекционное заболевание с преимущественным поражением печени и возможным исходом в цирроз и гепатоцеллюлярную карциному у лиц с хронической формой¹. Эта патология является серьезной проблемой для глобального здравоохранения. По оценке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в мире насчитывается >250 млн человек с диагнозом хронического ВГВ и ежегодно регистрируется ≈1,2 млн новых случаев инфекции². В Российской Федерации за последнее десятилетие заболеваемость ВГВ снижается: количество вновь выявленных случаев заражения ВГВ сократилось в 4 раза (с 1,32 до 0,33 на 100 тыс. населения)³. При положительной тенденции к уменьшению распространенности заболевания полная элиминация вируса не достигнута, о чем свидетельствуют летальные исходы, в том числе среди детского населения (1 летальный случай в 2021 г., 2 – в 2022 г.)⁴.

С целью формирования активного иммунитета, то есть достижения концентрации антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (анти-НВsAg) в крови не менее 10 МЕ/л, рекомендуется проведение иммунизации вакцинами на основе очищенного поверхностного антигена вируса гепатита В (НВsAg)⁵ [1]. Современные вакцины получают с помощью технологий рекомбинантной ДНК. Они содержат в своем составе НВsAg серотипов ауw и адw, которые наиболее распространены на территории нашей страны, поэтому считается, что любая подобная вакцина может обеспечить защиту населения от инфицирования вирусом гепатита В.

В Российской Федерации вакцинация против ВГВ включена в национальный календарь профилактических прививок⁶, но 100% охват населения не достигнут. Наиболее защищены от инфекции дети (97% вакцинированных)

и взрослые в возрасте от 18 до 35 лет (98% вакцинированных). Самый низкий процент иммунизированного населения наблюдается среди лиц старше 60 лет (44% вакцинированных)⁷.

Поддержание максимально высокого уровня вакцинации населения Российской Федерации является одной из приоритетных задач профилактики ВГВ. Показана роль активно-пассивной иммунизации в иммунопрофилактике ВГВ, предусматривающей одновременное введение иммуноглобулина человека против гепатита В (ИГЧГВ) и вакцины⁸ [2–5]. Такая схема введения обеспечивает немедленную пассивную защиту от заражения после контакта с инфекцией за счет поступления в кровотоки специфического иммуноглобулина и долгосрочную иммунизацию путем выработки собственных анти-НВsAg в ответ на введение вакцины [6].

Эффективность пассивной иммунопрофилактики зависит от специфической активности ИГЧГВ, которая характеризуется концентрацией анти-НВsAg. Ее определяют с использованием стандартных образцов (СО), аттестованных в международных единицах (МЕ), в иммуноферментном анализе⁹. Это позволяет унифицировать результаты тестирования и повысить точность определения основного показателя качества ИГЧГВ.

Изучение и систематизация информации о производстве, стандартизации и применении лекарственных препаратов ИГЧГВ позволит выявить существующие проблемы в данной сфере и определить пути их решения.

Цель работы – охарактеризовать лекарственные препараты иммуноглобулина человека против гепатита В и рассмотреть подходы к их стандартизации.

Проанализированы данные научных публикаций и нормативных актов в области профилактики ВГВ, производства и стандартизации ИГЧГВ.

¹ СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней.

² Hepatitis B Newsletter. WHO; 2024.

³ Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году». Роспотребнадзор; 2024.

⁴ Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году». Роспотребнадзор; 2023.

⁵ Technical Report No. 978. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. WHO; 2013.

⁶ Приказ Минздрава России от 06.12.2021 № 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок».

⁷ Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году». Роспотребнадзор; 2024.

⁸ Клинические рекомендации «Острый гепатит В (ГВ) у взрослых». Минздрав России; 2022.

Клинические рекомендации «Острый гепатит В (ОГВ) у детей». Минздрав России; 2021.

⁹ ФС.3.3.2.00012.18 Иммуноглобулин человека против гепатита В для внутримышечного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

ФС.3.3.2.00011.18 Иммуноглобулин человека против гепатита В для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

Информационный поиск проведен в электронных библиотеках PubMed, eLIBRARY и справочно-правовой системе «Консультант плюс».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Механизм действия и показания к применению иммуноглобулина человека против вируса гепатита В

Действующим веществом в составе ИГЧГВ является анти-НВsAg. Терапевтический эффект препарата достигается за счет высокоаффинного связывания специфических антител с НВsAg, который является основным компонентом оболочки вириона. Анти-НВsAg ориентированы преимущественно на связывание с α -детерминантой указанного антигена [7, 8], что обеспечивает защиту от вируса гепатита В всех серотипов. Противовирусный иммунитет формируется при нейтрализации вируса в кровотоке посредством блокирования рецепторов, отвечающих за связывание вируса с мембраной клетки-мишени [9]. Известно также, что анти-НВsAg способны экранировать клеточные рецепторы и эндоцитировать в гепатоциты, препятствуя проникновению вирионов в цитоплазму клетки [10].

При внутривенной инфузии ИГЧГВ сразу попадает в системный кровоток. Происходит его перераспределение между плазмой и внесосудистым пространством. Биодоступность такой лекарственной формы составляет 100%, а период полувыведения – в среднем 22 сут. Внутримышечное введение препарата позволяет создать максимальную концентрацию антител в крови только через 24 ч с периодом полувыведения от 4 до 5 нед. Утилизируется иммуноглобулин клетками ретикулоэндотелиальной системы¹⁰.

Введение ИГЧГВ показано лицам с недостаточной напряженностью поствакцинального иммунитета, которые нуждаются в постоянной профилактике по причине непрерывного риска инфицирования ВГВ¹¹. Экстренная профилактика заболевания с применением данного препарата рекомендована в случае контакта

с инфицированным материалом. Вирус может проникнуть в организм через поврежденные кожные покровы и слизистые оболочки при попадании на них зараженного биоматериала, при незащищенном половом акте, через плаценту от матери к плоду [11–15]. Применение ИГЧГВ показано лицам, контактирующим с носителями НВsAg или больными острым ВГВ; детям, рожденным от инфицированных матерей; медицинскому персоналу, работающему с кровью, ее компонентами и препаратами; не вакцинированным против гепатита В пациентам, регулярно получающим гемотрансфузии и препараты крови. ИГЧГВ применяют с целью иммунопрофилактики в комплексе с вакциной¹² [6, 16]. ИГЧГВ может быть использован для лечения легких и среднетяжелых форм острого ВГВ¹³.

Технологии производства иммуноглобулина человека против гепатита В

Лекарственные препараты ИГЧГВ производят из плазмы человека для фракционирования, заготовленной от здоровых вакцинированных доноров. Для вакцинации обычно используют доступные рекомбинантные вакцины против гепатита В: «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» (ЗАО НПК «Комбиотех», Россия)¹⁴ и «Регевак® В вакцина против гепатита В, рекомбинантная дрожжевая жидкая» (АО «Биннофарм», Россия)¹⁵. Вакцины производят на основе поверхностных антигенов вируса серотипов ауw и адw, что обеспечивает выработку у доноров высокопротективных специфических антител, активных в отношении наиболее распространенных серотипов вируса. Оценку напряженности иммунитета осуществляют через 30 сут после вакцинации. К донации иммуноспецифической плазмы допускают лиц, в сыворотке крови которых содержатся анти-НВsAg в концентрации не менее 7 МЕ/мл¹⁶. Для производства ИГЧГВ используется сырье, соответствующее требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации и не представляющее опасности заражения гемотрансмиссивными инфекциями¹⁷.

¹⁰ Инструкция к препарату «Антигеп® (Иммуноглобулин человека против гепатита В)». Инструкция к препарату «Антигеп-Нео® Иммуноглобулин человека против гепатита В хроматографически очищенный». Инструкция к препарату «Неогепатект (Иммуноглобулин человека против гепатита В)».

¹¹ Инструкция к препарату «Антигеп-Нео® Иммуноглобулин человека против гепатита В хроматографически очищенный».

¹² Инструкция к препарату «Антигеп® (Иммуноглобулин человека против гепатита В)». Инструкция к препарату «Антигеп-Нео® Иммуноглобулин человека против гепатита В хроматографически очищенный». Инструкция к препарату «Неогепатект (Иммуноглобулин человека против гепатита В)».

¹³ Инструкция к препарату «Антигеп® (Иммуноглобулин человека против гепатита В)».

¹⁴ Инструкция к препарату «Вакцина Гепатита В рекомбинантная дрожжевая суспензия для внутримышечного введения».

¹⁵ Инструкция к препарату «Регевак® В (Вакцина против гепатита В, рекомбинантная дрожжевая жидкая)».

¹⁶ Приказ Минздрава России от 21.11.2022 № 750н «Об утверждении порядка иммунизации доноров для заготовки иммуноспецифической плазмы».

¹⁷ ФС.3.3.2.0001.18 Плазма человека для фракционирования. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Иммуноглобулиновые препараты получают путем фракционирования донорской плазмы. В Российской Федерации нашел применение метод холодного этанольного фракционирования по Sohn [17]. Он включает в себя осаждение фибриногена; выделение и очистку фракции β - и γ -глобулинов; осаждение β -глобулинов и липоидов; выделение, концентрирование и очистку γ -глобулинов. Фракцию иммуноглобулинов класса G (IgG) с чистотой более 97% и минимальным содержанием примесей получают при соблюдении всех условий фракционирования. Высокая степень чистоты препаратов ИГЧГВ, а также инактивация и/или удаление патогенов (таких, как ВИЧ, вирусы гепатитов В и С) достигается благодаря включению в технологию производства следующих стадий: сольвент / детергентная обработка; противовирусная фильтрация; хроматографическая очистка; выдерживание при pH 4,0–4,5 и температуре 37 °C в течение 48 ч [18].

В Японии из-за нехватки гипериммунного сырья разрабатывают рекомбинантный противогепатитный иммуноглобулин на основе экспрессирующих анти-HBsAg В-клеток, которые получают от вакцинированных лиц после введения им одной бустерной дозы вакцины против гепатита В. В-клетки получают с использованием гибридной технологии (моноклеарные клетки периферической крови, трансформированные вирусом Эпштейна–Барр и гибридные с линией клеток миеломы) или сортировкой антигенспецифических В-клеток памяти. Комплементарную ДНК, кодирующую тяжелую и легкую цепи целевого антитела, клонируют в вектор экспрессии IgG1 и трансфицируют в клетки Expi293F (культура клеток, происходящая из клеток эмбриональной почки человека HEK293). Полученные рекомбинантные моноклональные антитела демонстрируют более сильную нейтрализующую активность *in vitro*, чем используемый в настоящее время ИГЧГВ [19]. Разработка таких препаратов является сложной задачей в связи с ограниченным доступом к техническим и финансовым ресурсам, а вывод на рынок представляется в весьма отдаленной перспективе.

Мировая практика применения иммуноглобулина человека против гепатита В

К настоящему времени показана результативность иммунопрофилактики с применением ИГЧГВ после трансплантации печени. Отмечено, что при введении ИГЧГВ в высоких дозах в течение длительного времени снижается риск рецидива антигенемии HBsAg (циркуляция указанного антигена в крови) [20, 21]. Анализ результатов

исследований позволил сделать вывод об эффективности применения ИГЧГВ в комбинации с вакциной и противовирусными препаратами. В этих случаях отмечено снижение риска рецидива заболевания до 50% [22–27].

Консультативным комитетом по практике иммунизации США (Advisory Committee on Immunization Practices) рекомендовано новорожденным от HBsAg-позитивных матерей в первые 12 ч жизни одновременное введение одной дозы ИГЧГВ (0,5 мл) внутримышечно и первой дозы вакцины против гепатита В. Совместное применение ИГЧГВ и вакцины требуется пациентам в случае контакта с зараженным биоматериалом, незащищенного полового акта или использования одной иглы с инфицированным лицом [6, 28, 29]. Рекомендации не изменились при пересмотре в 2018 г. и до сих пор используются для обоснования постконтактной иммунопрофилактики заболевания, предотвращения внутриутробного инфицирования ВГВ и дородовой иммунопрофилактики женщин [30, 31]. Считается, что комбинированная профилактика способна предупреждать перинатальную передачу вируса от матери ребенку во время беременности. Пассивная и активная иммунопрофилактика ВГВ при рождении в комбинации с применением противовирусных препаратов лежат в основе ключевой стратегии ВОЗ по глобальной элиминации вируса к 2030 г. [32–35].

Опыт применения ИГЧГВ, накопленный специалистами разных стран, свидетельствует о его значимой роли в иммунопрофилактике заболевания, поэтому в *таблице 1* приведены результаты информационного поиска наиболее распространенных в мире препаратов ИГЧГВ.

Специфическая активность препаратов ИГЧГВ, представленных на мировом фармацевтическом рынке (*табл. 1*), варьирует от 50 до 500 МЕ/мл. Из них 67% выпускается в лекарственной форме для внутримышечного введения, 30% – для внутривенного введения, 3% – для подкожного введения. Больше всего препаратов разработано в Германии (27%), Италии (17%) и США (17%). На долю Российской Федерации, Великобритании, Австрии, Индии, ЮАР, Японии, Малайзии, Швейцарии, Франции и Украины суммарно приходится 39% выпускаемого ИГЧГВ (*рис. 1*).

Российская практика применения иммуноглобулина человека против гепатита В

Первым стандартизованным ИГЧГВ в Российской Федерации считается лекарственный препарат для внутримышечного введения Антигеп®, содержащий 100 МЕ/доза анти-HBsAg

Таблица 1. Наиболее распространенные в мире препараты иммуноглобулина человека против гепатита В
Table 1. The most common human hepatitis B immunoglobulins in the world

Торговое наименование препаратов <i>Trade name</i>	Специфическая активность (содержание анти-НВsAg, МЕ/мл) <i>Potency (anti-HBsAg content, IU/mL)</i>	Лекарственная форма <i>Dosage form</i>
Германия / <i>Germany</i>		
Гепатитис В Иммуноглобулин Р Бейринг <i>Hepatitis B Immunoglobulin P Behring®</i>	200 МЕ/мл / <i>200 IU/mL</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Гепатект <i>Hepatect®</i>	50 МЕ/мл / <i>50 IU/mL</i>	Раствор для внутривенного введения <i>Solution for intravenous administration</i>
Наби-ГВ <i>Nabi-HB®</i>	>312 МЕ/мл / <i>>312 IU/mL</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Наби-ГВ НоваПлюс <i>Nabi-HB NovaPlus®</i>	>312 МЕ/мл / <i>>312 IU/mL</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Зутектра <i>Zutectra®</i>	500 МЕ/мл / <i>500 IU/mL</i>	Раствор для подкожного введения <i>Solution for subcutaneous administration</i>
Г-БИГ <i>H-BIG®</i>	220 МЕ/мл / <i>220 IU/mL</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Байхеп В <i>Bayhep B®</i>	217 МЕ/мл / <i>217 IU/mL</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Неогепатект <i>Neogepatect®</i>	50 МЕ/мл / <i>50 IU/mL</i>	Раствор для внутривенного введения <i>Solution for intravenous administration</i>
Италия / <i>Italy</i>		
Уман Биг <i>UMAN-BIG®</i>	180 МЕ/мл / <i>180 IU/mL</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Венбиг <i>VENBIG®</i>	50 МЕ/мл / <i>50 IU/mL</i>	Раствор для внутривенного введения <i>Solution for intravenous administration</i>
Гаймабиг <i>Haimabig®</i>	180 МЕ/мл / <i>180 IU/mL</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Гепуман В <i>Hepuman B®</i>	100 МЕ/мл / <i>100 IU/mL</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
ИммуноНВs <i>IMMUNOHBs®</i>	180 МЕ/мл / <i>180 IU/mL</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
США / <i>USA</i>		
ГепаГам В <i>HepaGam B®</i>	>312 МЕ/мл / <i>>312 IU/mL</i>	Раствор для внутривенного введения <i>Solution for intravenous administration</i>
ГепаГам В НоваПлюс <i>HepaGam B NovaPlus®</i>	>312 МЕ/мл / <i>>312 IU/mL</i>	Раствор для внутримышечного введения (возможно подкожное введение) <i>Solution for intramuscular administration</i> <i>(subcutaneous administration is possible)</i>
ГиперГЕП В <i>HyperHEP B®</i>	>220 МЕ/мл / <i>>220 IU/mL</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Геп-В-Гаммаджи <i>Hep-B-Gammagee®</i>	220 МЕ/мл / <i>220 IU/mL</i>	Раствор для внутривенного введения <i>Solution for intravenous administration</i>
Игантибе <i>Igantibe®</i>	200 МЕ/мл / <i>200 IU/mL</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Российская Федерация / <i>Russian Federation</i>		
Антигеп® <i>Antihep®</i>	100 МЕ/доза / <i>100 IU/dose</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Антигеп-Нео® Иммуноглобулин человека против гепатита В хроматографически очищенный <i>Antihep-Neo®, human hepatitis B immunoglobulin, purified by chromatography</i>	50 МЕ/мл / <i>50 IU/mL</i>	Раствор для инфузий <i>Solution for infusion</i>

Продолжение таблицы 1
 Table 1 (continued)

Торговое наименование препаратов <i>Trade name</i>	Специфическая активность (содержание анти-НВsAg, МЕ/мл) <i>Potency (anti-HBsAg content, IU/mL)</i>	Лекарственная форма <i>Dosage form</i>
Великобритания / <i>Great Britain</i>		
Иммуногам <i>ImmunoGam®</i>	>312 МЕ/мл / >312 IU/mL	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Гаммаглоб Антигепатитис ВР <i>Gammaglob Antihepatitis BP®</i>	>312 МЕ/мл / >312 IU/mL	Раствор для внутривенного введения <i>Solution for intravenous administration</i>
Австрия / <i>Austria</i>		
Аунатив <i>Aunativ®</i>	200 МЕ/мл / 200 IU/mL	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Индия / <i>India</i>		
Эль-геп <i>El-Hep®</i>	100 МЕ/мл / 100 IU/mL	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
ЮАР / <i>South Africa</i>		
ГебаГам ИМ <i>HebaGam IM®</i>	100 МЕ/мл / 100 IU/mL	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Япония / <i>Japan</i>		
Гебсбулин-ИГ <i>Hebsbulin-IG®</i>	200 МЕ/мл / 200 IU/mL	Раствор для внутривенного введения <i>Solution for intravenous administration</i>
Малайзия / <i>Malaysia</i>		
Гепабиг <i>Hepabig®</i>	200 МЕ/мл / 200 IU/mL	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Швейцария / <i>Switzerland</i>		
Гепуман Берна <i>Hepuman Berna®</i>	200 МЕ/мл / 200 IU/mL	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>
Франция / <i>France</i>		
Гамма Глоб Антигепа В <i>Gamma Glob Antihepa B®</i>	>312 МЕ/мл / >312 IU/mL	Раствор для внутривенного введения <i>Solution for intravenous administration</i>
Украина / <i>Ukraine</i>		
Гепатоиммун® <i>Hepatoimmun</i>	50 МЕ/мл / 50 IU/mL	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. МЕ – международная единица.
 Note. IU, international unit.

(по данным метода ИФА). При совместной работе ФГУП «Пермский НПО «Биомед», Пермской государственной медицинской академии им. академика Е.А. Вагнера, ЗАО НПК «Комбиотех» и ряда лечебно-профилактических учреждений Перми проведены клинические исследования безопасности и иммунологической эффективности активно-пассивной иммунопрофилактики новорожденных от НВsAg-позитивных матерей при использовании комбинации данного препарата и вакцины против гепатита В [36–39]. Показано отсутствие различий частоты появления и характера нежелательных явлений у пациентов, получавших препарат и вакцину,

и пациентов из группы сравнения (получали только вакцину) по схеме 0–1–2 мес. Вводимые с ИГЧГВ антитела не только не снижали иммунологическую эффективность вакцины, но и создавали защиту в течение периода времени, необходимого для выработки собственных антител.

В 2003 г. был запатентован способ лечения острого вирусного гепатита В, заключающийся во введении разовой дозы препарата Антигеп® в объеме 0,1 мл/кг массы тела один раз в день в течение трех дней [40]. В 2023 г. АО «НПО «Микроген» получило регистрационное удостоверение на первый отечественный ИГЧГВ для внутривенного введения –

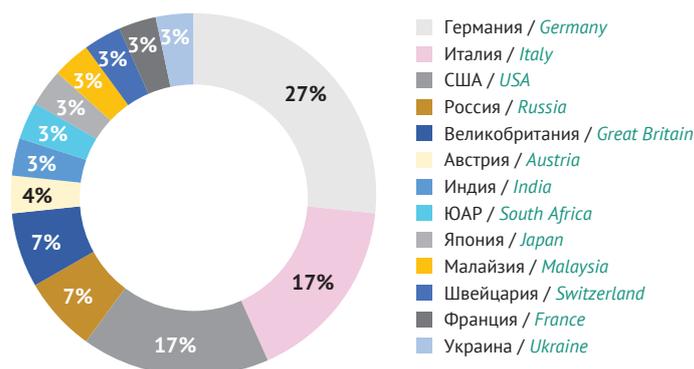


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 1. Доля препаратов иммуноглобулина человека против гепатита В, разработанных в разных странах мира.

Fig. 1. Percentage of human hepatitis B immunoglobulins developed in different countries of the world.

Антигеп-Нео®, изготавливаемый на основе вирусинактивации и хроматографической очистки с концентрацией специфических антител 50 МЕ/мл¹⁸. В настоящее время препарат зарегистрирован по процедуре Евразийского экономического союза.

В Российской Федерации зарегистрировано три препарата ИГЧГВ: Антигеп® (рег. № Р N000073/01 от 25.01.2012) и Антигеп-Нео® (рег. № ЛП-№ (005326)–(РГ–RU) от 26.04.2024) отечественного производства, а также Неогепатект (рег. № Р N015018/01 от 25.11.2008), выпускаемый в Германии¹⁹. Препараты представляют собой иммуноглобулины класса G, выделенные из плазмы крови доноров, вакцинированных против ВГВ. Препараты выпускают в форме растворов для внутримышечного (Антигеп®) и внутривенного введения (Антигеп-Нео®, Неогепатект)²⁰. За последние 5 лет в Россию ввезено 15 партий зарубежного препарата, однако это количество полностью не покрывает потребности лечебно-профилактических учреждений²¹. Препаратов Антигеп® и Антигеп-Нео® в настоящее время нет в гражданском обороте²². Развитие отечественной фарминдустрии лекарственных препаратов ИГЧГВ будет в значительной степени способствовать импортозамещению в области производства лекарственных средств для иммунопрофилактики ВГВ и повышению уровня защиты

населения Российской Федерации от инфицирования вирусом гепатита В.

Стандартизация лекарственных препаратов на основе иммуноглобулинов человека против гепатита В

Стандартизация лекарственных препаратов заключается в проведении контроля качества, обеспечении точности и метрологической прослеживаемости результатов тестирования. В Государственной фармакопее Российской Федерации есть рекомендации использовать аттестованные СО в целях стандартизации. К ним относят вещества, посредством сравнения с которыми осуществляют оценку показателей качества лекарственных средств с помощью физико-химических и биологических методов для подтверждения соответствия требованиям нормативной документации²³. Применение СО обеспечивает унификацию и точность результатов тестирования, а следовательно, приемлемо низкий риск некорректного заключения о качестве готовой продукции [41]. Стандартизация служит неотъемлемой частью метрологического обеспечения аналитических методик в фармацевтическом производстве и дает возможность оценивать правильность и стабильность работы тест-систем и лабораторного оборудования [42–44].

Эффективность иммунопрофилактики зависит от дозы препарата, которую рассчитывают исходя

¹⁸ Инструкция к препарату «Антигеп-Нео® Иммуноглобулин человека против гепатита В хроматографически очищенный».

¹⁹ <https://grls.minzdrav.gov.ru/>

²⁰ ФС.3.3.2.00012.18 Иммуноглобулин человека против гепатита В для внутримышечного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

ФС.3.3.2.00011.18 Иммуноглобулин человека против гепатита В для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

²¹ <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/turnover>

²² Там же.

²³ Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

Technical report series № 932. WHO expert committee on biological standardization. WHO; 2006.

ОФС.1.1.0007 Стандартные образцы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1; 2024.

из его специфической активности. Эта характеристика – основной показатель качества ИГЧГВ, которую оценивают по содержанию действующего вещества (анти-НВsAg). Показатель определяют методом ИФА при чувствительности разрешенных к применению в Российской Федерации тест-систем не ниже 10 МЕ/л²⁴. Фармакологическое действие ИГЧГВ связано с высокой специфической активностью, которая в десятки тысяч раз превышает защитный уровень поствакцинальных антител. Согласно Государственной фармакопее Российской Федерации этот показатель должен быть не менее 100 и 50 МЕ/мл для препаратов, выпускаемых в форме растворов для внутримышечного и внутривенного введения соответственно. Требования к специфической активности импортных препаратов основаны на нормативных документах выпускающих стран.

При проведении тестирования используют СО, аттестованный в международных единицах²⁵. В 2007 г. ВОЗ утвердила второй международный СО, который произведен в США из готовой серии препарата ИГЧГВ с концентрацией белка 50 г/л и до настоящего времени реализуется Национальным институтом биологических стандартов и контроля (NIBSC, Великобритания). Идентификационный номер продукта 07/164. СО представляет собой лиофилизат иммуноглобулина с содержанием анти-НВsAg 100 МЕ/ампула. Специалисты из 22 независимых лабораторий в 12 странах участвовали в работах по его аттестации. Специфическую активность определяли хемилюминесцентным, радиоиммунным и иммуноферментным методами с использованием 19 различных методик анализа [45]²⁶.

Российские фармпроизводители зачастую не имеют возможности приобретения международного СО из-за логистических затруднений. Кроме того, в соответствии с требованиями отечественной нормативной документации в сфере разработки СО необходимо

определять статистическую неопределенность аттестованного значения, а данный показатель для международного СО не оценивается [46]. В Российской Федерации на фармацевтическом рынке был представлен отраслевой стандартный образец СО-42-2815488, аттестованный по содержанию анти-НВsAg, который производили в Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича. В настоящее время его выпуск прекращен.

В Кировском научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови ведутся исследования по разработке национального (фармакопейного) СО для определения специфической активности иммуноспецифической плазмы и получаемых из нее препаратов ИГЧГВ. Формируется донорский резерв для заготовки иммуноспецифической плазмы, получены кандидаты в СО в форме лиофилизата и проводятся испытания их стабильности [47–49].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании систематизированы данные о механизме действия и технологии получения препаратов ИГЧГВ, клинической эффективности и показаниях к применению. Охарактеризована номенклатура лекарственных средств, выпускаемых как в Российской Федерации, так и за рубежом. Изложены подходы к стандартизации ИГЧГВ. Представлены сведения о существующих СО для оценки специфической активности препаратов.

Анализ литературы указал на значимость ИГЧГВ в иммунопрофилактике гепатита В и необходимость создания национального (фармакопейного) СО для оценки его специфической активности. Это будет способствовать стандартизации и повышению качества выпускаемых лекарственных средств и более эффективной профилактике вирусного гепатита В.

Литература/References

1. Озерецковский НА, Шалунова НВ, Петручук ЕМ, Индикова ИН. Вакцинопрофилактика гепатита В. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015;14(2):87–95. Ozeret-skovsky NA, Shalunova NV, Petrushuk EM, Indikova IN. Vaccinal prevention of hepatitis B. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2015;14(2):87–95 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2015-14-2-87-95>
 2. Wei KP, Zhu FC, Liu JX, Yan L, Lu Y, Zhai XJ, et al. The efficacy of two different dosages of hepatitis B immunoglobulin combined with hepatitis B vaccine in preventing
- ²⁴ ФС.3.3.2.00012.18 Иммуноглобулин человека против гепатита В для внутримышечного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.
ФС.3.3.2.00011.18 Иммуноглобулин человека против гепатита В для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.
- ²⁵ Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Technical report series № 932. WHO expert committee on biological standardization. WHO; 2006.
- ²⁶ Second International Standard for anti-hepatitis B surface antigen (anti-НВs) immunoglobulin, human NIBSC code: 07/164 Instruction for use. WHO; 2008.

- mother-to-child transmission of hepatitis B virus: A prospective cohort study. *Vaccine*. 2018;36(2):256–63. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.037>
3. Zhou M, Li L, Han L, Sun F, Yi N. Breast-feeding is not a risk factor of mother-to-child transmission of hepatitis B virus. *Int J Gen Med*. 2021;14:1819–27. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S289804>
 4. Рулева АА, Харит СМ. Вакцинация детей, рожденных раньше срока. *Журнал инфектологии*. 2023;15(4):25–34. Ruleva AA, Kharit SM. Vaccination of premature newborns. *Journal Infectology*. 2023;15(4):25–34 (In Russ.). <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2023-15-4-25-34>
 5. Шабунин АВ, Сметанина СВ, Дроздов ПА. Результаты применения мультидисциплинарного подхода в лечении больных циррозом печени в исходе хронических вирусных гепатитов. *Эффективная фармакотерапия*. 2022;18(22):20–24. Shabunin AV, Smetanina SV, Drozdov PA. Results of using a multidisciplinary approach in the treatment of patients with liver cirrhosis as a result of chronic viral hepatitis. *Effective Pharmacotherapy*. 2022;18(22):20–24 (In Russ.). <https://doi.org/10.33978/2307-3586-2022-18-22-20-24>
 6. Zuckerman JN. Review: Hepatitis B immune globulin for prevention of hepatitis B infection. *J Med Virol*. 2007;79(7):919–21. <https://doi.org/10.1002/jmv.20816>
 7. Franco E, Bagnato B, Marino MG, Meleleo C, Serino L, Zaratti L. Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries. *World J Hepatol*. 2012;4(3):74–80. <https://doi.org/10.4254/wjh.v4.i3.74>
 8. Moradi A, Zhand S, Ghaemi A, Javid N, Tabarraei A. Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Golestan Province–Iran. *Virus Genes*. 2012;44(3):382–7. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0715-z>
 9. Gao Y, Zhang TY, Yuan Q, Xia NS. Antibody-mediated immunotherapy against chronic hepatitis B virus infection. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(8):1768–73. <https://doi.org/10.1080/12645515.2017.1319021>
 10. Schilling R, Ijaz S, Davidoff M, Lee JY, Locarnini S, Williams R, Naoumov NV. Endocytosis of hepatitis B immune globulin into hepatocytes inhibits the secretion of hepatitis B virus surface antigen and virions. *J Virol*. 2003;77(16):8882–92. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.16.8882-8892.2003>
 11. Das S, Ramakrishnan K, Behera SK. Hepatitis B vaccine and immunoglobulin: Key concepts. *Clin Transl Hepatol*. 2019;7(2):165–71. <https://doi.org/10.14218/ICTH.2018.00037>
 12. World Health Organisation. Hepatitis B vaccines: WHO position paper, July 2017 – Recommendations. *Vaccine*. 2019;37(2):223–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.046>
 13. Akarsu M, Onem S, Turan I, Adali G, Akdogan M, Akyildiz M, et al. Recommendations for hepatitis B immunoglobulin and antiviral prophylaxis against hepatitis B recurrence after liver transplantation. *Turk J Gastroenterol*. 2021;32(9):712–9. <https://doi.org/10.5152/tjg.2021.21608>
 14. Lee WC, Chou HS, Wu TH, Cheng CH, Lee CF, Wang YC, et al. Low-dose anti-hepatitis B immunoglobulin regimen as prophylaxis for hepatitis B recurrence after liver transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2019;21(6):e13190. <https://doi.org/10.1111/tid.13190>
 15. Капильный ВА, Рейштан ДЮ, Беришвили МВ, Жолобова МН. Гепатиты В и С при беременности. *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева*. 2021;8(3):121–31. Kaptilnyu VA, Reyshtat DY, Berishvili MV, Zholobova MN. Hepatitis B and C during pregnancy. *V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology*. 2021;8(3):121–31 (In Russ.). <https://doi.org/10.17816/2313-8726-2021-8-3-121-131>
 16. Habib S, Shaikh OS. Hepatitis B immune globulin. *Drugs Today (Barc)*. 2007;43(6):379–94. <https://doi.org/10.1358/dot.2007.43.6.1050792>
 17. Петров ВФ, Николаева АМ, Казьянин АВ, Пархоменко ТГ, Борисова ВН, Мельникова ВА, Буданов МВ. Противовирусный препарат и способ получения иммуноглобулина для профилактики и лечения вирусных заболеваний. Патент Российской Федерации № 2144379; 2000. Petrov VF, Nikolaeva AM, Kaz'janin AV, Parkhomenko TG, Borisova VN, Mel'nikov VA, Budanov MV. Antiviral preparation and method of preparing immunoglobulin for prophylaxis and treatment of patient with viral diseases. Patent of the Russian Federation No. 2144379; 2000 (In Russ.). EDN: [PYWECF](https://doi.org/10.1111/trf.17382)
 18. Кудашева ЭЮ, Борисевич ИВ, Бондарев ВП, Миронов АН. Технологические аспекты обеспечения вирусной безопасности препаратов иммуноглобулинов человека. *Медицинская иммунология*. 2015;17:270–1. Kudasheva EYu, Borisevich IV, Bondarev VP, Mironov AN. Technological aspects of ensuring viral safety of human immunoglobulin preparations. *Medical Immunology*. 2015;17:270–1 (In Russ.). EDN: [UQDDVY](https://doi.org/10.1111/trf.17382)
 19. Furuta RA, Yasui T, Minamitani T, Akiba H, Toyoda C, Tobita R, et al. Development of a recombinant hepatitis B immunoglobulin derived from B cells collected from healthy individuals administered with hepatitis B virus vaccines: A feasibility study. *Transfusion*. 2023;63(6):1204–14. <https://doi.org/10.1111/trf.17382>
 20. Krüger M. European hepatitis B immunoglobulin trials: Prevention of recurrent hepatitis B after liver transplantation. *Clin Transplant*. 2000;14(2):14–9. PMID: 10965959
 21. Shouval D, Samuel D. Hepatitis B immune globulin to prevent hepatitis B virus graft reinfection following liver transplantation: A concise review. *Hepatology*. 2000;32(6):1189–95. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.19789>
 22. Yan ML, Yan LN, Li B, Zeng Y, Wen TF, Wang WT, et al. Intramuscular hepatitis B immune globulin combined with lamivudine in prevention of hepatitis B recurrence after liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2006;5(3):360–3. PMID: [16911931](https://doi.org/10.1016/j.dld.2009.09.005)
 23. Angus PW, Patterson SJ. Liver transplantation for hepatitis B: What is the best hepatitis B immune globulin/antiviral regimen? *Liver Transpl*. 2008;14(2):S15–22. <https://doi.org/10.1002/lt.21614>
 24. Filippini F, Franchello A, Carrai P, Romagnoli R, De Simone P, Woodward MK, et al. Efficacy, safety, and pharmacokinetics of intramuscular hepatitis B immune globulin, Igantibe, for the prophylaxis of viral B hepatitis after liver transplantation. *Dig Liver Dis*. 2010;42(7):509–14. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2009.09.005>
 25. Selcuk H, Karakayali H, Haberal M. Liver transplant and chronic hepatitis B virus infection. *Exp Clin Transplant*. 2011;9(2):94–7. PMID: [21453226](https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001171)
 26. De Simone P, Romagnoli R, Tandoi F, Carrai P, Ercolani G, Peri E, et al. Early introduction of subcutaneous hepatitis B immunoglobulin following liver transplantation for hepatitis B virus infection: A prospective, multicenter study. *Transplantation*. 2016;100(7):1507–12. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001171>
 27. Park JS, Gayam V, Pan CQ. Review article: Preventing hepatitis B graft infection in hepatitis B patients after liver transplantation: immunoglobulin vs anti-virals. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;52(6):944–54. <https://doi.org/10.1111/apt.15999>
 28. Mast EE, Margolis HS, Fiore AE, Brink EW, Goldstein ST, Wang SA, et al. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Part I: Immunization of infants, children, and adolescents. *MMWR Recomm Rep*. 2005;54(RR-16):1–31. PMID: [16371945](https://doi.org/10.1111/apt.15999)
 29. Mast EE, Weinbaum CM, Fiore AE, Alter MJ, Bell BP, Finelli L, et al. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Part II: Immunization of

- adults. *MMWR Recomm Rep*. 2006;55(RR-16):1–33. PMID: [17159833](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17159833/)
30. Schillie S, Vellozzi C, Reingold A, Harris A, Haber P, Ward JW, Nelson NP. Prevention of hepatitis B Virus infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Recomm Rep*. 2018;67(1):1–31. <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6701a1>
 31. Garofoli GK. Updated vaccination and screening recommendations for hepatitis B: Implications for pharmacists. *J Am Pharm Assoc*. 2024;64(5):102150. <https://doi.org/10.1016/j.japh.2024.102150>
 32. Veronese P, Dodi I, Esposito S, Indolfi G. Prevention of vertical transmission of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2021;27(26):4182–93. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i26.4182>
 33. Wang H, Fang JW, Gu ZW, Song DJ, Chen Y, Chen GD, et al. Application of hepatitis B immunoglobulin in prevention of mother-to-child transmission of chronic hepatitis B in HBsAg- and HBeAg-positive mother. *J Obstet Gynaecol*. 2022;42(5): 877–82. <https://doi.org/10.1080/01443615.2021.1946495>
 34. Zubkova I, Zhao Y, Cui Q, Kachko A, Gimie Y, Chabot S, et al. Assessing the impact of hepatitis B immune globulin (HBIG) on responses to hepatitis B vaccine during co-administration. *Vaccine*. 2023;41(4):955–64. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.12.055>
 35. You H, Wang F, Li T, Xu X, Sun Y, Nan Y, et al. Guidelines for the prevention and treatment of chronic hepatitis B (version 2022). *J Clin Transl Hepatol*. 2023;11(6):1425–42. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2023.00320>
 36. Казьянин АВ, Ведерникова НВ, Вязникова ТВ, Пленкина СВ. Изучение фармакодинамики анти-НВс при разных схемах введения препарата АНТИГЕП и вакцины против гепатита В в эксперименте. В кн.: *Материалы Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы вакцино-сывороточного дела в XXI веке»*. Пермь; 2003. С. 86–9. Kazyanin AV, Vedernikova NV, Vyaznikova TV, Plenkina SV. Studying the pharmacodynamics of anti-HBs in different regimens of administration of the drug ANTIHEP and hepatitis B vaccine in an experiment. In: *Materials of the All-Russian Scientific Conference “Topical issues of vaccine and serum work in the XXI century”*. Perm; 2003. P. 86–9 (In Russ.).
 37. Казьянин АВ, Пленкина СВ, Николаева АМ, Борисова ВН, Ведерникова НВ, Вашин АЛ. Оценка реактогенности отечественного специфического иммуноглобулина человека против гепатита В АНТИГЕП и комбинированной вакцины БУБО-М при иммунизации контактных лиц в очагах. В кн.: *Материалы Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы вакцино-сывороточного дела в XXI веке»*. Пермь; 2003. С. 122–5. Kazyanin AV, Plenkina SV, Nikolaeva AM, Borisova VN, Vedernikova NV, Vashin AL. Evaluation of the reactogenicity of the domestic specific human immunoglobulin against hepatitis B ANTI-GEP and the combined BUBO-M vaccine during immunization of contact persons in foci. In: *Materials of the All-Russian Scientific Conference “Topical issues of vaccine and serum work in the XXI century”*. Perm; 2003. P. 122–5 (In Russ.).
 38. Казьянин АВ, Пленкина СВ, Фельдблюм ИВ, Борисова ВН. Сравнительная оценка различных схем иммунизации против гепатита В детей в закрытых организованных коллективах. *Пермский медицинский журнал*. 2004;(2):103–7. Kazyanin AV, Plenkina SV, Feldblum IV, Borisova VN. Comparative assessment of various immunization schemes against hepatitis B in children in closed organized groups. *Perm Medical Journal*. 2004;(2):103–7 (In Russ.).
 39. Воробьева НН, Казьянин АВ, Борисова ВН, Мышкина ОК, Рысинская ТК, Николаева АМ, Дедова ОВ. Эффективность специфического иммуноглобулина (Антигеп) при остром вирусном гепатите В. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2004;(2):13–6. Vorobyova NN, Kazyanin AV, Borisova VN, Myshkina OK, Rysinskaya TK, Nikolaeva AM, Dedova OV. The effectiveness of specific immunoglobulin (Antihep) in acute viral hepatitis B. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2004;2(15):13–16 (In Russ.).
 40. Борисова ГН, Николаева АМ, Воробьева НН, Казьянин АВ, Рысинская ТН, Мышкина ОК, Дедова ОВ. Способ лечения острого вирусного гепатита В. Патент Российской Федерации № 2240824; 2003. Borisova GN, Nikolaeva AM, Vorobyova NN, Kazyanin AV, Rysinskaya TN, Myshkina OK, Dedova OV. Method for the treatment of acute viral hepatitis B. Patent of the Russian Federation No. 2240824; 2003 (In Russ.). EDN: [BODTLP](https://patent.gov.ru/entry/2240824)
 41. Леонтьев ДА. Система вторичных стандартных образцов в лабораториях контроля качества лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(1):50–5. Leontiev DA. The system of secondary reference standards in drug quality control laboratories. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(1):50–5 (In Russ.). EDN: [VSBNDX](https://vesti.ncepp.ru/entry/201601050)
 42. Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Волкова РА, Климов ВИ, Шемерякина ТБ, Яшкир ВА. Фармакопейные стандартные образцы и практика их применения в отечественной системе стандартизации лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2016;50(4):40–3. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2016-50-4-40-43> Merkulov VA, Sakanyan EI, Volkova RA, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkir VA. Pharmacopeia standard samples and their practical application in the national drug standardization system. *Pharm Chem J*. 2016;50(4):258–61. <https://doi.org/10.1007/s11094-016-1433-y>
 43. Борисевич ИВ, Кудашева ЭЮ, Перельгина ОВ, Миронов АН, Меркулов ВА, Бондарев ВП и др. Состояние проблемы стандартизации специфических иммуноглобулинов и анитоксических сывороток. *Медицинская иммунология*. 2015;17(S):379. Borisevich IV, Kudashева EYu, Perelygina OV, Mironov AN, Merkulov VA, Bondarev VP, et al. The state of the problem of standardization of specific immunoglobulins and antitoxic serums. *Medical Immunology*. 2015;17(S):379 (In Russ.). EDN: [UQDDMF](https://doi.org/10.1007/s11094-016-1433-y)
 44. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Устинникова ОБ, Саркисян КА, Мовсесянц АА, Меркулов ВА, Косенко ВВ. 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>
 45. Ferguson M, Yu MW, Heath A. Calibration of the second International Standard for hepatitis B immunoglobulin in an international collaborative study. *Vox Sang*. 2010;99(1):77–84. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2010.01314.x>
 46. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Климов ВИ, Саканян ЕИ, Олефир ЮВ, Меркулов ВА и др. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(4):229–36. Volkova RA, Fadeikina OV, Klimov VI, Sakanyan EI, Olefir YuV, Merkulov VA., et al. Topical issues related to reference standards in the sphere of circulation of biological products. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(4):229–36 (In Russ.). EDN: [XEHMCSB](https://doi.org/10.30895/2221-996X-2016-16-4-229-36)
 47. Коновалова ЕА, Кормщикова ЕС. Стандартизация лекарственных препаратов иммуноглобулина человека против гепатита В по показателю качества «Специфи-

- ческая активность» (обзор литературы). В кн.: *Материалы XIV Всероссийской научной конференции «Молодая фармация – потенциал будущего»*. СПб.: СПХФУ; 2024. С. 624–7. Konvalova EA, Kormshchikova ES. Standardization of human immunoglobulin drugs against hepatitis B according to the quality indicator “Specific activity” (literature review). In: *Materials of the XIV All-Russian Scientific Conference “Young pharmacy – potential of the future”*. St. Petersburg: SPHFU; 2024. P. 624–7 (In Russ.).
48. Коновалова ЕА, Калинина ЕН, Росина ЕВ, Зиганшина СЕ, Кормщикова ЕС. Поиск потенциальных доноров иммуноспецифической плазмы, содержащей антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В. В кн.: *Материалы XIV Всероссийской научной конференции «Молодая фармация – потенциал будущего»*. СПб.: СПХФУ; 2024. С. 47–8. Konvalova EA, Kalinina EN, Rosina EV, Ziganshina SE, Kormshchikova ES. Search for potential donors of immunospecific plasma containing antibodies to the surface antigen of the hepatitis B virus. In: *Materials of the XIV All-Russian Scientific Conference “Young pharmacy – potential of the future”*. St. Petersburg: SPHFU; 2024. P. 47–8 (In Russ.).
49. Коновалова ЕА, Росина ЕВ, Калинина ЕН, Зиганшина СЕ, Пивошенко ЯД, Кормщикова ЕС. Получение кандидатов в стандартный образец иммуноглобулина человека против гепатита В. В кн.: *Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные вопросы трансфузиологии и онкогематологии»*. Киров; 2024. С. 43–52. Konvalova EA, Rosina EV, Kalinina EN, Ziganshina SE, Pivoshenko YaD, Kormshchikova ES. Obtaining candidates reference standard of human immunoglobulin against hepatitis B. In: *Materials of the Scientific and Practical Conference of young scientists and specialists “Current issues of transfusiology and oncohematology”*. Kirov; 2024. P. 43–52 (In Russ.). EDN: [LNORWG](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.А. Коновалова** – анализ источников литературы, написание и оформление текста рукописи, формулировка выводов; **Е.Н. Калинина, Е.С. Кормщикова** – концепция работы, формулировка выводов, редактирование текста рукописи; **Е.В. Росина, С.Е. Зиганшина** – редактирование текста рукописи; **К.А. Воробьев, И.В. Парамонов** – участие в формулировке выводов, утверждение окончательной версии рукописи для публикации. **Благодарности.** Коллектив авторов благодарит Н.М. Поздеева, Н.А. Зорину, С.В. Самарину, М.А. Логинову и Д.А. Дьяконова за ценные консультации при подготовке рукописи статьи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.A. Konvalova** analysed the literature, drafted and designed the manuscript, and formulated the conclusions. **E.N. Kalinina** and **E.S. Kormshchikova** conceptualised the study, formulated the conclusions, and edited the manuscript. **E.V. Rosina** and **S.E. Ziganshina** edited the manuscript. **K.A. Vorobiev** and **I.V. Paramonov** participated in the formulation of the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The author team thanks N.M. Pozdееv, N.A. Zorina, S.V. Samarina, M.A. Loginova, and D.A. Dyakonov for valuable advice in preparing the manuscript.

Об авторах / Authors

Коновалова Екатерина Анатольевна / Ekaterina A. Konvalova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8508-6365>

Калинина Елена Николаевна / Elena N. Kalinina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9754-5522>

Кормщикова Елена Сергеевна, канд. биол. наук / Elena S. Kormshchikova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8158-8445>

Росина Елена Владимировна / Elena V. Rosina

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0228-5115>

Зиганшина Светлана Евгеньевна / Svetlana E. Ziganshina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0949-3783>

Воробьев Константин Анатольевич, д-р биол. наук / Konstantin A. Vorobiev, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4386-5835>

Парамонов Игорь Владимирович, д-р мед. наук / Igor V. Paramonov, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7205-912X>

Поступила 10.09.2024

После доработки 14.11.2024

Принята к публикации 06.12.2024

Online first 28.04.2025

Received 10 September 2024

Revised 14 November 2024

Accepted 6 December 2024

Online first 28 April 2025



Аттестация фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности адсорбированного столбнячного анатоксина на морских свинках

Е.И. Комаровская[✉], О.В. Фадейкина, К.А. Лыско, Р.А. Волкова, О.Г. Корнилова

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

✉ Комаровская Елена Игоревна; Komarovskaya@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время национальный фармакопейный стандартный образец (ФСО.3.2.00247) для оценки активности адсорбированного столбнячного анатоксина (СА) аттестован только на мышах, в то время как международный стандартный образец (МСО) ВОЗ аттестован на двух видах животных — мышах и морских свинках. В связи с формированием регуляторной системы Евразийского экономического союза (ЕАЭС) и гармонизацией Фармакопеи ЕАЭС с Европейской фармакопеей актуально дополнить аттестованную характеристику ФСО.3.2.00247 значением специфической активности, установленной методом летального заражения на морских свинках.

ЦЕЛЬ. Определение величины специфической активности фармакопейного стандартного образца адсорбированного столбнячного анатоксина методом летального заражения на морских свинках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе использовали четвертый МСО ВОЗ адсорбированного СА (4th WHO International Standard for tetanus toxoid adsorbed), ФСО для оценки активности адсорбированного СА (ФСО.3.2.00247, серия 011-210619). Определение специфической активности ФСО адсорбированного СА проводили методом летального заражения относительно МСО на морских свинках в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи (монография 2.7.8). В работе использованы 352 аутбредные морские свинки весом 250–350 г. Животных по 8–10 особей равномерно распределяли по опытным группам для проведения иммунизации: 4 группы для МСО и ФСО соответственно. Через 28–30 сут проводили инъекции столбнячного токсина — 50 LD₅₀. Результат оценивали в течение 5 сут, регистрируя клинические признаки столбнячной интоксикации согласно международной шкале. Для контроля активности столбнячного токсина группе неиммунизированных животных из той же партии вводили соответственно 2; 1; 0,5; 0,25 LD₅₀ токсина. Величину специфической активности ФСО и LD₅₀ токсина рассчитывали по формуле Кербера.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Разработана программа аттестации ФСО.3.2.00247 (серия 011-210619). Проведена аттестация ФСО методом летального заражения на морских свинках. По результатам четырех испытаний установлено значение специфической активности ФСО.3.2.00247, которое составило 220 МЕ/ампула. Полученные экспериментальные данные являются основанием для внесения изменений в паспорт ФСО.3.2.00247 (серия 011-210619) путем дополнения его значением активности, определенным на морских свинках (220 МЕ/ампула). Представленные результаты свидетельствуют о возможности использования ФСО не только в методе летального заражения, но и в альтернативных методах контроля, в том числе в иммуноферментном анализе.

ВЫВОДЫ. Аттестованная характеристика фармакопейного стандартного образца адсорбированного столбнячного анатоксина может быть дополнена значением специфической активности, установленной методом летального заражения на морских свинках — 220 МЕ/ампула.

Ключевые слова: фармакопейный стандартный образец; международный стандартный образец; специфическая активность; метод летального заражения; адсорбированный столбнячный анатоксин; АКДС-вакцина

Для цитирования: Комаровская Е.И., Фадейкина О.В., Лыско К.А., Волкова Р.А., Корнилова О.Г. Аттестация фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности адсорбированного столбнячного анатоксина на морских свинках. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(2):182–192. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-182-192>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. О.В. Фадейкина является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2025 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Certification of a pharmacopoeial reference standard for potency testing of adsorbed tetanus toxoid in guinea pigs

Elena I. Komarovskaya , Olga V. Fadeikina, Ksenia A. Lysko, Rauza A. Volkova, Olga G. Kornilova

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

 Elena I. Komarovskaya; Komarovskaya@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Currently, the national pharmacopoeial reference standard (RS) FSO.3.2.00247 for the potency of adsorbed tetanus toxoid (TT) is certified only in mice, whereas the WHO International Standard (IS) for TT is certified in two animal species – mice and guinea pigs. Given the development of the Eurasian Economic Union (EAEU) regulatory framework and the harmonization of the EAEU Pharmacopoeia with the European Pharmacopoeia, it is necessary to augment the certified characteristic of FSO.3.2.00247 with the potency value determined by the lethal challenge assay in guinea pigs.

AIM. This study aimed to determine the potency of the pharmacopoeial reference standard for tetanus toxoid adsorbed using the lethal challenge assay in guinea pigs.

MATERIALS AND METHODS. The study used the 4th WHO International Standard for tetanus toxoid adsorbed and the FSO for potency testing of TT adsorbed (FSO.3.2.00247, series 011-210619). The potency of the pharmacopoeial RS was assessed relative to the IS using the lethal challenge method in guinea pigs, in accordance with the European Pharmacopoeia (monograph 2.7.8). A total of 352 outbred guinea pigs (250–350 g) were used. Animals were evenly distributed into experimental groups (8–10 animals per group) for immunization: four groups for the IS and four for the pharmacopoeial RS. After 28–30 days, the animals were injected with tetanus toxin (50 LD₅₀). Results were evaluated over five days, with clinical signs of tetanus intoxication monitoring in accordance with the international scoring system. To control tetanus toxin activity, a group of non-immunized animals received injections of 2, 1, 0.5, and 0.25 LD₅₀ of the toxin. The potency of the pharmacopoeial RS and the LD₅₀ of the toxin were calculated using Kerber's formula.

RESULTS. A certification program for FSO.3.2.00247 (series 011-210619) was developed. The pharmacopoeial RS was certified using the lethal challenge assay in guinea pigs. Four experimental studies were shown that the potency of FSO.3.2.00247 was determined to be 220 IU/ampoule. Specification of FSO.3.2.00247 (series 011-210619) may be augmented with the potency value 220 IU/ampoule for guinea pigs based on the findings obtained. The results demonstrate that pharmacopoeial RS may be used not only in the lethal challenge assay but also in alternative methods for quality control, including enzyme-linked immunosorbent assay.

CONCLUSIONS. The certified characteristic of the pharmacopoeial reference standard for potency testing of tetanus toxoid adsorbed may be augmented with the potency value determined by the lethal challenge assay in guinea pigs – 220 IU/ampoule.

Keywords: pharmacopoeial reference standard; international standard; potency; lethal challenge method; tetanus toxoid adsorbed; DPT vaccine

For citation: Komarovskaya E.I., Fadeikina O.V., Lysko K.A., Volkova R.A., Kornilova O.G. Certification of a pharmacopoeial reference standard for potency testing of adsorbed tetanus toxoid in guinea pigs. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(2):182–192. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-182-192>

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. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. O.V. Fadeikina has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2025. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Адсорбированный столбнячный анатоксин (СА) является одним из основных компонентов вакцин для профилактики столбняка для всех возрастных групп населения. СА входит также в состав комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша (АКДС-вакцины). АКДС-вакцина включена в национальные календари профилактических прививок¹ [1, 2]. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) установлены требования для оценки качества АКДС-вакцин².

Для вакцин против столбняка, используемых для первичной иммунизации младенцев, ВОЗ определены требования к специфической (иммуногенной) активности в международных единицах (МЕ). Показатель специфической активности в прививочной дозе (0,5 мл) для адсорбированного СА должен составлять не менее 40 МЕ в тесте на морских свинках и не менее 60 МЕ в тесте на мышах³. Специфическую активность определяют путем сравнения с международными стандартными образцами (МСО) или национальными стандартными образцами (СО), откалиброванными относительно МСО⁴.

Активность действующего четвертого МСО адсорбированного СА (4th WHO International Standard for tetanus toxoid adsorbed) была определена методом летального заражения на морских свинках и мышах⁵. Этот метод признан «золотым стандартом» для оценки активности адсорбированного СА. Национальные

СО и любые вторичные СО должны быть откалиброваны относительно действующего МСО с применением метода летального заражения на морских свинках или мышах⁶. В Российской Федерации фармакопейный стандартный образец (ФСО) ФСО.3.2.00247 для оценки активности адсорбированного СА аттестован относительно МСО методом летального заражения на мышах.

Морские свинки более чувствительны к воздействию столбнячного токсина, чем мыши [3, 4]. Исследования по оценке специфической активности первых двух международных стандартов адсорбированного СА продемонстрировали различия в чувствительности между линиями мышей (BALB/c, NIH, CFW): значения специфической активности существенно варьировали. Показатели, полученные на морских свинках, характеризовались отсутствием значимых отклонений⁷. В связи с этим многие производители вакцин (например, Пентаксим, Адасель) оценивают специфическую активность адсорбированного СА методами с использованием морских свинок. Методы, применяемые производителями, являются арбитражными, несмотря на наличие в нормативной документации альтернативного метода летального заражения на мышах в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации⁸ (ГФ РФ).

Согласно Европейской фармакопее величину специфической активности адсорбированного СА устанавливают при помощи следующих методов: метод летального заражения на морских

¹ https://immunizationdata.who.int/global/wiise-detail-page/vaccination-schedule-for-tetanus?ISO_3_CODE=&TARGETPOP_GENERAL=GENERAL

² WHO Expert Committee on Biological Standardization. 40th report. Technical Report Series No. 800. WHO; 1990.

³ Там же.

⁴ WHO Expert Committee on Biological Standardization. 40th report. Technical Report Series No. 800. WHO; 1990. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

⁵ <https://nibsc.org/documents/ifu/08-218.pdf>

⁶ Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

⁷ Lyng J. Potency assays in mice and in guinea-pigs of adsorbed tetanus toxoid. WHO/BS/83.1395. Geneva: WHO; 1983. <https://iris.who.int/handle/10665/60067>

⁸ ОФС 1.7.2.0004.15 Иммуногенность адсорбированного столбнячного анатоксина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

свинках (метод А) или на мышах (метод В); серологический метод (метод С)⁹. Последний метод применяют для определения уровня защитных противостолбнячных антител в сыворотке крови лабораторных животных: морские свинки (метод иммуноферментного анализа, ИФА) или мыши (метод ингибирования токсина, Toxin Binding Inhibition, ToBI).

Во всех указанных методах для оценки специфической активности адсорбированного СА применяют параллельную иммунизацию морских свинок или мышей исследуемой вакциной и СО, калиброванным в МЕ. После иммунизации животных подвергают разрешающему подкожному заражению столбнячным токсином (метод летального заражения) или проводят забор крови (серологический метод). В последнем случае в сыворотке крови определяют титр антитоксических антител методом *in vitro* (метод С).

В настоящее время в Европейском союзе серологические методы являются предпочтительными с точки зрения реализации Директивы 2010/63/EU «О защите животных, используемых в научных целях» и принципов 3Rs («replacement/refinement/reduction», «замена/улучшение/сокращение») ¹⁰. Основные цели реализации принципов 3Rs состоят в замене экспериментов на животных и сокращении количества животных, уменьшении их боли и страданий, а также в усовершенствовании методов, при выполнении которых невозможно отказаться от животных [5, 6].

В Российской Федерации осуществляется работа по формированию единых подходов к оценке качества комбинированных вакцин на территории государств – членов Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Основной задачей является интеграция и гармонизация нормативных требований Фармакопеи ЕАЭС с положениями Европейской фармакопеи ¹¹ [7, 8]. В связи с процессом гармонизации методов контроля качества вакцин высокую значимость приобретает совершенствование применяемых в России методов испытаний, что потребует дополнение характеристик ФСО. Установление дополнительной величины специфической активности СА на морских свинках обеспечит возможность использования ФСО в методах контроля, предусмотренных Фармакопеей ЕАЭС (аналогично Европейской фармакопее), включая метод летального заражения и определение титров

антител в сыворотке крови вакцинированных животных. Это особенно важно для метода ИФА, в котором предусмотрено использование морских свинок для одновременной оценки иммунного ответа к столбнячному и дифтерийному компонентам комбинированных вакцин.

Цель работы – определение величины специфической активности фармакопейного стандартного образца адсорбированного столбнячного анатоксина методом летального заражения на морских свинках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы:

- четвертый МСО адсорбированного СА с активностью 490 МЕ/ампула на морских свинках и 260 МЕ/ампула на мышах (4th WHO International Standard for tetanus toxoid adsorbed, 490 IU/ampoule for guinea pig, 260 IU/ampoule for mice; NIBSC code: 08/218)¹²;
- ФСО для оценки активности адсорбированного СА (реестровый номер ФСО.3.2.00247, серия 011-210619). Лиофилизат в виде пористой таблетки белого цвета; ампулы, 1 мл. Производитель кандидата в ФСО: АО «НПО «Микроген» (Россия, 2018 г.). ФСО приготовлен из очищенного СА, адсорбированного на гидроксиде алюминия, с добавлением стабилизаторов: 1,5% желатина (конечная концентрация) и 10% сахарозы (конечная концентрация). Содержание СА в ампуле – 20 ЕС (единицы связывания). Специфическая активность (аттестованная характеристика), установленная методом летального заражения на мышах – 180 МЕ/ампула;
- глицериновый раствор столбнячного токсина («Пермское НПО «Биомед», Россия);
- стерильный 0,9% раствор натрия хлорида (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России).

Лабораторные животные

Исследование проводили на аутбредных морских свинках весом от 250 до 350 г, полученных из питомника филиала «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России. Всего в исследовании было использовано 352 морские свинки (самцы, самки). Животные одного пола были равномерно распределены по клеткам (по 4–5 особей в зависимости от экспериментальной группы). В период проведения исследования животных содержали

⁹ 2.7.8 Assay of tetanus vaccine (adsorbed). European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2008.

¹⁰ <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj/eng>

¹¹ Методические руководства по созданию Фармакопеи Евразийского экономического союза и иных документов по контролю качества лекарственных средств. Евразийская экономическая комиссия, Фармакопейный комитет евразийского экономического союза. М.; 2024.

¹² <https://nibsc.org/documents/ifu/08-218.pdf>

в изолированном помещении конвенционального вивария при температуре 22–24 °С и относительной влажности воздуха 45–60% в условиях свободного доступа к воде и корму на стандартном рационе кормления. В качестве подстилки использовали древесные опилки.

Морских свинок иммунизировали подкожно исследуемыми ФСО и МСО в объеме 1 мл. Контрольная группа состояла из неиммунизированных животных, взятых из той же партии. Через 28–30 сут вводили подкожно опытную дозу 50 LD₅₀/мл раствора столбнячного токсина. Все манипуляции (иммунизация, заражение, наблюдение) проводили в утренние часы. В ходе исследования применяли принцип «гуманной конечной точки». Животных, у которых регистрировали клинические признаки столбнячной интоксикации, соответствующие стадии Т3 (тяжелые симптомы, вызывающие чрезмерные страдания), подвергали эвтаназии с использованием автоматизированной системы подачи углекислого газа в соответствии с существующими нормами гуманного обращения с лабораторными животными¹³. После завершения исследований всех оставшихся животных также подвергали эвтаназии тем же методом.

Протокол исследования с использованием экспериментальных животных был одобрен Локальным этическим комитетом ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (протокол № 11 от 17.04.2025). Исследование проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных научных целях¹⁴, принципами Международного совета медицинских научных обществ (CIOMS)¹⁵, ГОСТ 33216-2014¹⁶ и нормами надлежащей лабораторной практики (GLP)¹⁷.

Оборудование

Дозаторы одноканальные переменного объема (100–1000 мкл, 500–5000 мкл, Eppendorf AG, Германия) относительная погрешность не более 1%; холодильник POZIS XF-400 (з-д Серго Орджоникидзе, Россия); морозильник Саратов 106 (ООО «СЭПО-ЗЭМ», Россия); весы электронные Tanita BD-590 (Tanita Corporation, Япония),

предел допустимой погрешности ±0,05 г, класс точности III; ламинарный бокс микробиологической безопасности II класса, тип В2 (БМБ-II-1,2, ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

Методы

Метод летального заражения (метод множественных разведений). Животных распределяли на опытные группы – по 8–10 особей для иммунизации МСО и ФСО (по 4 группы на каждый препарат). Для подтверждения корректности выбранной дозы столбнячного токсина формировали 4 контрольные группы по 4 неиммунизированные особи из той же партии.

Разведения МСО и ФСО готовили *ex tempore* в асептических условиях. После вскрытия ампул МСО и ФСО с соблюдением мер предосторожности (избегая распыления содержимого) вносили стерильный 0,9% раствор натрия хлорида для получения исходного разведения (исходный раствор, ИР). Далее готовили серию двукратных разведений (табл. 1, 2).

Растворы с разведениями ФСО и МСО (по 1 мл) вводили животным подкожно в брюшную область (у окончания грудины). Через 28–30 сут вводили 1 мл столбнячного токсина в дозе 50 LD₅₀ подкожно в бедро (верхняя треть задней поверхности бедра). LD₅₀ определяли как дозу, вызывающую гибель 50% зараженных морских свинок в течение 5 сут. Контроль активности токсина проводили на неиммунизированных морских свинках, вводя подкожно 2; 1; 0,5; 0,25 LD₅₀ (расчетная величина) столбнячного токсина в объеме 1 мл.

За животными опытных и контрольной групп наблюдали ежедневно в течение 5 сут, регистрируя количество павших особей и клинические проявления столбняка в каждой группе. Признаки столбнячной интоксикации определяли по шкале оценки клинических проявлений столбняка¹⁸: Т1 – небольшая ригидность конечности, трудно определяемая визуально; Т2 – парез конечности, с сохранением частичной функциональности; Т3 – паралич одной задней конечности, неохотное передвижение животного, формирование сколиоза с характерной «бананообразной» деформацией туловища; Т4 – конечность полностью ригидна, пальцы

¹³ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.09.2023 № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».

¹⁴ European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS No.123. Strasbourg; 1986. <https://norecopa.no/media/2iydns5h/ets-123-original.pdf>

¹⁵ <https://cioms.ch/>

¹⁶ ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

¹⁷ Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

¹⁸ 2.7.8 Assay of tetanus vaccine (adsorbed). European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2008. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

Таблица 1. Схема приготовления разведений международного стандартного образца (МСО) адсорбированного столбнячного анатоксина (пример)

Table 1. Scheme for preparing dilutions of the International Standard (IS) for tetanus toxoid adsorbed (example)

Разведение <i>Dilution</i>	Объем МСО, мл <i>IS volume, mL</i>	Объем 0,9% раствора натрия хлорида, мл <i>Sodium chloride 0.9% volume, mL</i>	Содержание столбнячного анатоксина, МЕ/мл (иммунизирующая доза) <i>Tetanus toxoid content, IU/mL (immunizing dose)</i>
I (исходный раствор) <i>I (stock solution)</i>	1 ампула (490 МЕ/ампула) <i>1 ampoule (490 IU/ampoule)</i>	1,3	377 (исходный раствор; не вводят животным) <i>377 (stock solution; do not administer to animals)</i>
II	0,25 мл разведения I <i>0.25 mL of dilution I</i>	23,25	4
III	11,0 мл разведения II <i>11.0 mL of dilution II</i>	11,0	2
IV	11,0 мл разведения III <i>11.0 mL of dilution III</i>	11,0	1
V	11,0 мл разведения IV <i>11.0 mL of dilution IV</i>	11,0	0,5

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Таблица 2. Схема приготовления разведений фармакопейного стандартного образца для оценки активности адсорбированного столбнячного анатоксина (пример)

Table 2. Scheme for preparing dilutions of the pharmacopoeial reference standards for potency testing of tetanus toxoid adsorbed (example)

Разведение <i>Dilution</i>	Объем ФСО, мл <i>FSO volume, mL</i>	Объем 0,9% раствора натрия хлорида, мл <i>Sodium chloride 0.9% volume, mL</i>	Содержание исходного раствора в 1 мл (иммунизирующая доза) <i>Stock solution content per 1 mL (immunizing dose)</i>
I	1 ампула, МЕ/ампула <i>1 ampoule, IU/ampoule</i>	1,0 (исходный раствор) <i>1.0 (stock solution)</i>	Исходный раствор; не вводят животным <i>Stock solution; not administered to animals</i>
II	0,8 мл разведения I <i>0.8 mL of dilution I</i>	31,2	0,025
III	16,0 мл разведения II <i>16.0 mL of dilution II</i>	16,0	0,0125
IV	16,0 мл разведения III <i>16.0 mL of dilution III</i>	16,0	0,00625
V	16,0 мл разведения IV <i>16.0 mL of dilution IV</i>	16,0	0,003125

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. ФСО – фармакопейный стандартный образец (ФСО 3.2.00247, серия 011-210619).

Note. FSO, pharmacopoeial reference standard (FSO.3.2.00247, series 011-210619).

неподвижны, выраженное мышечное сокращение конечности, обычно наблюдается сколиоз; T5 – столбнячные судороги, продолжительные тонические спазмы мышц; летальный исход.

Животных, достигших стадии T3 или выше по шкале клинических проявлений столбняка, подвергали эвтаназии. Стадию T3 рассматривали в качестве «гуманной конечной точки», поскольку она характеризуется клиническими признаками, приводящими к летальному исходу животного [9, 10]. Согласно биоэтическим нормам «гуманная конечная точка» определяется как один или несколько физиологических или поведенческих показателей, свидетельствующих о необходимости прекращения или уменьшения боли и страданий экспериментального

животного, закончив болезненную процедуру или прибегнув к эвтаназии [9, 10].

На основании полученных результатов рассчитывали величины ED_{50} (доза препарата, обеспечивающая защиту от гибели 50% иммунизированных животных в течение 5 сут) для МСО и ФСО, введенных иммунизированным животным, используя формулу Кербера (1) [11]:

$$\lg ED_{50} = \lg D_N - \lg b \times (\sum L_i - 0,5), \quad (1)$$

где D_N – максимальная испытанная доза (МЕ/мл – для МСО, ИР/мл – для ФСО); b – кратность разведения; L_i – отношение количества выживших животных без признаков столбняка к общему числу животных, получивших данную дозу; $\sum L_i$ – сумма значений L_i для всех использованных доз.

Значение LD_{50} столбнячного токсина, введенного животным, вычисляли согласно формуле Кербера (2):

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - \lg b \times (\sum L_i - 0,5), \quad (2)$$

где D_N – максимальная испытанная доза токсина; b – кратность разведения; L_i – отношение количества особей с признаками столбнячной интоксикации к общему числу животных в контрольной группе; $\sum L_i$ – сумма значений L_i для всех использованных доз.

Было проведено четыре испытания ФСО адсорбированного СА.

Расчет значений аттестованной характеристики фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности адсорбированного столбнячного анатоксина. Количество МЕ в 1 мл исследуемого препарата рассчитывали, сравнивая дозы МСО и ФСО, вызывающие одинаковый защитный эффект (ED_{50}). Специфическую активность ФСО в МЕ/мл (A) вычисляли по формуле (3):

$$A = \frac{ED_{50} \text{ МСО}}{ED_{50} \text{ ФСО}}, \quad (3)$$

где значения ED_{50} МСО (МЕ) и ED_{50} исследуемого ФСО (мл) рассчитывали по формуле Кербера (1).

С учетом исходного разведения исследуемого ФСО определяли содержание МЕ в одной ампуле лиофилизированного препарата ФСО.

Расчет значений LD_{50} столбнячного токсина. Вычисляли значение LD_{50} столбнячного токсина, введенного иммунизированным животным, используя формулу Кербера (2). Экспериментальный протокол предусматривал введение животным не менее $50 LD_{50}$.

Пример расчета значения LD_{50} столбнячного токсина. Для кратности разведения $b=2$ и $\sum L_i=2,25$: $\lg LD_{50} = \lg 2 - \lg 2 \times (2,25 - 0,5) = 0,301 - 0,301 \times 1,75 = -0,22577$. Соответственно, расчетное значение $LD_{50} = \text{anti } \lg (-0,22577) = 0,5946$. Таким образом, иммунизированным животным введена заражающая доза $84,1 LD_{50}$ ($50 / 0,5946$) столбнячного токсина.

Критерии приемлемости испытания

- Наименьшее разведение МСО и ФСО (максимальная доза) должно защищать более половины животных.
- Наибольшее разведение МСО и ФСО (минимальная доза) должно защищать менее половины животных.
- Рассчитанные значения ED_{50} для ФСО и МСО должны находиться между максимальной и минимальной введенными дозами.

- Все морские свинки, получившие дозу токсина $2 LD_{50}/\text{мл}$, должны погибнуть или иметь клинические проявления столбнячной интоксикации стадии ТЗ и выше.
- Все животные, получившие дозу токсина $0,25 LD_{50}/\text{мл}$, должны выжить без клинических проявлений столбнячной интоксикации.
- Заражающая доза столбнячного токсина не менее $50 LD_{50}$.

Статистическая обработка результатов.

Значение аттестованной характеристики определяли как среднее арифметическое всех повторностей. Статистический анализ выполняли с использованием программы Microsoft Office Excel, рассчитывая среднеарифметическое значение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Программа аттестации

Определение значения аттестованной характеристики проводили биологическим методом летального заражения (challenge assay) в соответствии с Европейской фармакопеей (метод А)¹⁹ по методике, применявшейся в международных коллаборативных исследованиях при аттестации четвертого МСО адсорбированного СА [12]. Четвертый МСО был аттестован в 2011 г. в рамках исследований с участием 34 лабораторий из 22 стран мира, включая лабораторию анатоксинов и антитоксических препаратов Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича (в настоящее время – ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России). Согласно протоколу, разработанному ВОЗ, испытания проводили на двух видах животных (морские свинки и мыши), одновременно оценивая возможность применения данного МСО в серологическом методе ИФА [12].

На основании экспериментальных материалов проведенных исследований была разработана Программа аттестации ФСО адсорбированного СА (ФСО.3.2.00247, серия 011-210619). Подбор разведений МСО и исследуемого ФСО осуществляли на основе ретроспективного анализа данных, полученных участниками исследований.

Испытания по аттестации специфической активности ФСО адсорбированного СА на морских свинках проводили одновременно с испытаниями по аттестации ФСО 3.2.00247 на мышах в период с 2021 по 2024 гг. Сроки проведения испытаний были обусловлены ограниченной

¹⁹ 2.7.8 Assay of tetanus vaccine (adsorbed). European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2008.

доступностью МСО (NIBSC code: 08/218). Всего было проведено четыре испытания.

Определение специфической активности фармакопейного стандартного образца адсорбированного столбнячного анатоксина

Было проведено четыре испытания ФСО адсорбированного СА (ФСО 3.2.00247, серия 011-210619) (табл. 3). В рамках предварительных испытаний

(испытания № 1 и № 2) были отработаны экспериментальные условия. На основании степени проявлений столбнячной интоксикации у животных оптимальными разведениями ФСО для дальнейшей работы были признаны условия испытания № 2.

Было продемонстрировано, что все четыре испытания соответствовали критериям приемлемости. На основании проведенных испытаний среднее значение специфической активности

Таблица 3. Результаты определения специфической активности фармакопейного стандартного образца адсорбированного столбнячного анатоксина (ФСО 3.2.00247, серия 011-210619) методом летального заражения на морских свинках

Table 3. Results of the potency determination for the pharmacopoeial reference standard of tetanus toxoid adsorbed (FSO.3.2.00247, series 011-210619) by the lethal challenged assay in guinea pigs

№ испытания Study No.	СО (n – число животных в группе) SS (n – number of animals per group)	Иммунизирующая доза СО <i>Immunizing dose of SS</i>		L _i	ED ₅₀ (расчетные единицы) <i>ED₅₀</i> (calculated units)	Специфическая активность (A), МЕ/мл <i>Potency (A), IU/mL</i>	Контроль активности столбнячного токсина <i>Tetanus toxin activity control</i>	
		Содержание исходного раствора СО в 1 мл <i>Stock solution content of SS per 1 mL</i>	МЕ/мл <i>IU/mL</i>				L _i [#] (n=16)	Заражающая доза <i>Challenge dose</i>
1	ФСО / FSO (n=8)	0,0182	–	0,8750	0,0091 (мл) / (mL)	239,7	2,25	84,1 LD ₅₀
		0,0091	–	0,5000				
		0,0046	–	0,1250				
		0,0023	–	0,0000				
	МСО / IS (n=8)	–	4	1,0000	2,1810 (МЕ) / (IU)			
		–	2	0,3750				
		–	1	0,0000				
		–	0,5	0,0000				
2	ФСО / FSO (n=8)	0,025	–	0,7500	0,0149 (мл) / (mL)	190,27	3,00	141 LD ₅₀
		0,0125	–	0,3750				
		0,00625	–	0,1250				
		0,003125	–	0,0000				
	МСО / IS (n=8)	–	4	0,7500	2,8284 (МЕ) / (IU)			
		–	2	0,1250				
		–	1	0,1250				
		–	0,5	0,0000				
3	ФСО / FSO (n=10)	0,025	–	1,0000	0,0077 (мл) / (mL)	226,27	2,00	70,7 LD ₅₀
		0,0125	–	0,8000				
		0,00625	–	0,3000				
		0,003125	–	0,1000				
	МСО / IS (n=10)	–	4	0,9000	1,7411 (МЕ) / (IU)			
		–	2	0,6000				
		–	1	0,2000				
		–	0,5	0,0000				

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

№ испытания Study No.	СО (n – число животных в группе) SS (n – number of animals per group)	Иммунизирующая доза СО Immunizing dose of SS		L _i	ED ₅₀ (расчетные единицы) ED ₅₀ (calculated units)	Специфическая активность (A), МЕ/мл Potency (A), IU/mL	Контроль активности столбнячного токсина Tetanus toxin activity control	
		Содержание исходного раствора СО в 1 мл Stock solution content of SS per 1 mL	МЕ/мл IU/mL				L _i [#] (n=16)	Заражающая доза Challenge dose
4	ФСО / FSO (n=10)	0,025	–	0,9000	0,0103 (мл) / (mL)	226,27	1,75	59,5 LD ₅₀
		0,0125	–	0,6000				
		0,00625	–	0,2000				
		0,003125	–	0,1000				
	МСО / IS (n=10)	–	4	0,8000	2,2974 (МЕ) / (IU)	A _{avg} = 220,6		
		–	2	0,4000				
		–	1	0,1000				
		–	0,5	0,0000				

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

Примечание. СО – стандартный образец; ФСО – фармакопейный стандартный образец (ФСО 3.2.00247, серия 011-210619); МСО – международный стандартный образец; МЕ – международные единицы; ED₅₀ – доза препарата, обеспечивающая защиту от гибели 50% иммунизированных животных в течение 5 сут; L_i – отношение количества выживших животных без явлений столбняка к общему числу животных в группе; * показатель L_i (контроль активности токсина проводили суммарно по 4 группам) – отношение количества особей с признаками столбнячной интоксикации к общему числу животных в контрольной группе; A_{avg} – среднее значение специфической активности; «–» – не применимо.

Note. SS, standard sample; FSO, pharmacopoeial reference standard (FSO.3.2.00247, series 011-210619); IS, international standard; IU, international units; ED₅₀, dose providing 50% protection of immunized animals from death within 5 days; L_i, ratio of animals surviving without tetanus symptoms to total animals in group; # L_i, index (control of toxin activity was carried out in total for 4 groups) – ratio of animals exhibiting tetanus intoxication signs to total animals in the control group; A_{avg}, average value of potency; –, not applicable.

адсорбированного СА, определенное на морских свинках, составило 220 МЕ/ампула.

Таким образом, аттестованная характеристика действующего ФСО (серия 011-210619) активности адсорбированного СА, помимо ранее установленного значения специфической активности на мышах (180 МЕ/ампула), может быть дополнена значением активности, определенным методом летального заражения на морских свинках (220 МЕ/ампула).

В рамках гармонизации Фармакопеи ЕАЭС с Европейской фармакопеей аттестация ФСО адсорбированного СА приобретает существенное практическое значение. ФСО (серия 011-210619) применим не только в методе летального заражения, но и в ИФА – методе для определения титра противостолбнячных антител у морских свинок. Данный метод предполагает оценку специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов в сыворотке крови одного животного, что требует иммунизации морских свинок как дифтерийной, так и столбнячной референс-вакцинами. Наличие аттестованного национального стандартного образца для оценки специфической активности на двух видах

животных, позволит: 1) расширить область применения стандарта; 2) исключить зависимость от зарубежных СО; 3) существенно снизить стоимость проведения испытаний.

Оценка стабильности фармакопейного стандартного образца адсорбированного столбнячного анатоксина

Для изучения стабильности был проведен ретроспективный анализ данных по применению ФСО для оценки активности адсорбированного СА (серия 011-210619), аттестованного в 2018 г. взамен отраслевого СО предыдущей серии (серия 10; использовалась в период с 1990 по 2018 г.). За период использования данного СО было выполнено более 800 испытаний, при этом снижения специфической активности зарегистрировано не было. СО хранился при температуре не выше минус 18 °С (при долговременном хранении), в условиях транспортировки, а также в условиях хранения у потребителя (от 2 до 8 °С в защищенном от света месте). Подтверждение значения специфической активности осуществлялось ежегодно относительно действующего МСО.

ФСО (серия 011-210619) был изготовлен по методике, аналогичной применяемой для производства предыдущей серии СО (серия 10). Образцы кандидата в ФСО хранились при температуре не выше минус 18 °С. Данные, полученные в 2018–2024 гг. при проведении аттестации и подтверждения значения специфической активности ФСО (серия 011-210619) относительно МСО, а также в ходе рутинного контроля качества вакцин и адсорбированного СА на мышах (суммарно более 80 результатов), достоверно подтверждают стабильность ФСО. На основании этих данных можно предположить, что значение аттестованной характеристики, установленное на морских свинках, будет стабильным. Мониторинг стабильности ФСО (серия 011-210619) по дополнительной аттестованной характеристике предусмотрен программой аттестации.

ВЫВОДЫ

1. Проведена аттестация фармакопейного стандартного образца для оценки активности адсорбированного столбнячного анатоксина (ФСО.3.2.00247, серия 011-210619) методом летального заражения на морских свинках. Значение аттестованной характеристики, установленное относительно международного стандартного образца (NIBSC code: 08/218), составило 220 МЕ/ампула.
2. Полученные экспериментальные данные являются основанием для внесения изменений в паспорт ФСО 3.2.00247 (серия 011-210619) путем дополнения его значением активности, определенным на морских свинках (220 МЕ/ампула).
3. Представленные результаты свидетельствуют о возможности использования ФСО 3.2.00247 (серия 011-210619) не только в методе летального заражения, но и в альтернативных методах контроля качества.

Литература/References

1. Jones CE, Danovaro-Holliday MC, Mwinnyaa G, Gacic-Dobo M, Francis L, Grevendonk J, et al. Routine vaccination coverage – Worldwide, 2023. *MMWR*. 2024;73(43):978–84. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7343a4>
2. Shattock AJ, Johnson HC, Sim SY, Carter A, Lambach P, Hutubessy RCW, et al. Contribution of vaccination to improved survival and health: modelling 50 years of the Expanded Programme on Immunization. *Lancet*. 2024;403(10441):2307–16. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(24\)00850-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(24)00850-x)
3. Popoff MR. Tetanus in animals. *J Vet Diagn Invest*. 2020; 32(2):184–91. <https://doi.org/10.1177/1040638720906814>
4. Gupta RK, Anderson R, Cecchini D, Rost B, Xu J, Gendreau K, et al. Evaluation of a guinea pig model to assess interference in the immunogenicity of different components of a combination vaccine comprising diphtheria, tetanus and acellular pertussis (DTaP) vaccine and haemophilus influenzae type B capsular polysaccharide conjugate vaccine. *Biologicals*. 1999;27(2):167–76. <https://doi.org/10.1006/biol.1999.0204>
5. Lilley E, Coppens E, Das P, Galaway F, Isbrucker R, Sheridan S, et al. Integrating 3Rs approaches in WHO guidelines for the batch release testing of biologicals: Responses from a survey of vaccines and biological therapeutics manufacturers. *Biologicals*. 2023;81:101660. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2022.11.002>
6. Hassall L, Yara DA, Riches-Duit R, Rigsby P, Dobby A, Vermeulen M, et al. Development of a monoclonal antibody sandwich ELISA for the quality control of human and animal tetanus vaccines. *ALTEX*. 2024;41(4):588–604. <https://doi.org/10.14573/altex.2401171>
7. Шахназаров БА. Фармакопея ЕАЭС как гармонизирующая основа требований к качеству лекарственных средств в ЕАЭС и за его пределами. *Актуальные проблемы российского права*. 2022;17(11):183–93. Shakhnazarov BA. The EAEU Pharmacopoeia as a harmonizing basis for the requirements for the quality of medicines in the EAEU and beyond. *Actual Problems of Russian Law*. 2022;17(11):183–93 (In Russ.). <https://doi.org/10.17803/1994-1471.2022.144.11.183-193>
8. Корнилова ОГ, Багирова ВЛ. Фармакопейная стандартизация биологических лекарственных препаратов: основные принципы в условиях единого фармацевтического рынка стран Евразийского экономического союза. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(1):71–82. Kornilova OG, Bagirova VL. Pharmacopoeial standardisation of biological medicinal products: Basic principles for the common pharmaceutical market of the Eurasian Economic Union. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(1):71–82 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-1-71-82>
9. Hendriksen CFM, Steen B. Refinement of vaccine potency testing with the use of humane endpoints. *ILAR J*. 2000;41(2):105–13. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.2.105>
10. Stokes W. Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. *ILAR J*. 2002;43(Suppl 1):31–8. https://doi.org/10.1093/ilar.43.Suppl_1.S31
11. 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.).
12. Tierney R, Stickings P, Hockley J, Rigsby P, Iwaki M, Sesardic D. Collaborative study for the calibration of a replacement International Standard for Tetanus Toxoid Adsorbed. *Biologicals*. 2011;39(6):404–16. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.09.007>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.И. Комаровская** – разработка дизайна и проведение экспериментальных исследований, систематизация, статистическая обработка, оформление и интерпретация результатов; написание текста рукописи, формулировка выводов исследования; **О.В. Фадейкина** – анализ результатов, написание, редактирование и переработка текста рукописи; **К.А. Лыско** – редактирование и формулировка выводов; **Р.А. Волкова** – обсуждение программы аттестации, редактирование текста рукописи; **О.Г. Корнилова** – обсуждение и анализ результатов.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования с использованием экспериментальных животных был одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (протокол № 11 от 17.04.2025).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.I. Komarovskaya** designed the study; conducted experimental research; performed statistical analysis; systematized, and interpreted the results; drafted the manuscript and formulated the conclusions. **O.V. Fadeikina** analyzed the results, drafted and revised the manuscript. **K.A. Lysko** edited the text, formulated the conclusions. **R.A. Volkova** discussed the certification program and edited the manuscript. **O.G. Kornilova** discussed and analyzed the results.

Ethics approval. The protocol of the animal study was approved by the Local Ethics Committee at the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation (Protocol No. 11 of 17 April 2025).

Об авторах / Authors

Комаровская Елена Игоревна / **Elena I. Komarovskaya**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9035-6072>

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук / **Olga V. Fadeikina**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

Лыско Ксения Андреевна, канд. техн. наук / **Ksenia A. Lysko**, Cand. Sci. (Techn.)

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

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук / **Rauza A. Volkova**, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

Корнилова Ольга Геннадьевна, д-р фарм. наук / **Olga G. Kornilova**, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1439-2052>

Поступила 12.03.2025

После доработки 28.05.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Received 12 March 2025

Revised 28 May 2025

Accepted 6 June 2025



Лиофилизация стандартизированных по количеству жизнеспособных клеток микроорганизмов в низкой концентрации: разработка режима высушивания

А.А. Воропаев , Ю.И. Крысанова, О.В. Фадейкина, Р.М. Валюхова, Д.С. Давыдов

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

 Воропаев Андрей Андреевич; voropaev@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Современные подходы к микробиологическим испытаниям в фармацевтической промышленности требуют использования стандартизированных по количеству жизнеспособных клеток тест-штаммов микроорганизмов. Наиболее удобной формой для их хранения и транспортировки является лиофилизированное состояние, обеспечивающее длительное сохранение жизнеспособности микроорганизмов. В научной литературе хорошо описаны различные режимы высушивания микроорганизмов в высокой концентрации (10^7 – 10^{12} КОЕ/мл). Однако такие режимы нельзя напрямую применять при работе со стандартизированными по количеству жизнеспособными клетками в низкой концентрации (10^3 КОЕ/мл). Определение оптимального режима лиофилизации позволит решить проблему сохранения жизнеспособности клеток микроорганизмов в низкой концентрации.

ЦЕЛЬ. Разработка режима высушивания с использованием аппарата камерного типа, обеспечивающего выживаемость тест-штаммов микроорганизмов, стандартизированных по количеству жизнеспособных клеток в концентрации 10^3 КОЕ/мл.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе использовали тест-штаммы микроорганизмов *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и 6538P, *Alcaligenes faecalis* 415, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 10240. Тест-штаммы лиофилизировали в сахарозо-желатиновой защитной среде, используя лиофильный аппарат камерного типа Martin Christ Epsilon 2-4 LSCplus.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В экспериментах были установлены оптимальные параметры лиофильного высушивания микроорганизмов в концентрации 10^3 КОЕ/мл в аппарате камерного типа: замораживание до минус 25 °С; первичное высушивание при температуре полки минус 35 °С и вакууме 0,4 мбар в течение 8 ч; досушивание при температуре 30 °С в течение 4 ч и остаточном давлении 0,001 мбар. Выживаемость тест-штаммов в низкой концентрации составляла от 22 до 100% в зависимости от вида микроорганизма. Качество полученных образцов тест-штаммов соответствовало показателю «Потеря в массе при высушивании», значения которого варьировались от 0,8 до 2,1%.

ВЫВОДЫ. Разработанный режим высушивания позволяет сохранять количество жизнеспособных клеток микроорганизмов, стандартизированных в низкой концентрации, используя лиофильный аппарат камерного типа. Замораживание ниже температуры эвтектики может снижать выживаемость микробных клеток после высушивания, как это показано для *A. faecalis* 415. Оценка выживаемости группы из восьми микроорганизмов в низкой концентрации после лиофилизации проведена впервые в России.

Ключевые слова: лиофилизация; тест-штаммы; замораживание; первичное высушивание; досушивание; сублимация

Для цитирования: Воропаев А.А., Крысанова Ю.И., Фадейкина О.В., Валюхова Р.М., Давыдов Д.С. Лиофилизация стандартизированных по количеству жизнеспособных клеток микроорганизмов в низкой концентрации: разработка режима высушивания. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(2):193–202. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-193-202>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Фадейкина О.В. — член редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2025 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Lyophilization of microorganisms standardized by the number of viable cells in low concentration: Development of a drying mode

Andrey A. Voropaev[✉], Yulia I. Krysanova, Olga V. Fadeikina, Ruzilya M. Valyukhova, 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. Modern approaches to microbiological testing in the pharmaceutical industry require the use of microbial test strains standardized by the number of viable cells. The most convenient form for storage and transportation is lyophilized state, which ensures long-term preservation of the viability of microorganisms. Various drying modes for microorganisms in high concentrations (10^7 – 10^{12} CFU/mL) are described in the scientific literature. However, such modes cannot be directly applied while working with standardized by the number of viable cells containing 10^3 CFU/mL. Selection of the optimal lyophilization mode allows solving the problem of preserving the viability of microbial cells in a low concentration.

AIM. Development of a drying mode using a chamber-type apparatus that ensures the survival of microbial test strains standardized by the number of viable cells at a concentration of 10^3 CFU/mL.

MATERIALS AND METHODS. Microbial test strains *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and 6538P, *Alcaligenes faecalis* 415, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 10240 and Martin Christ Epsilon 2-4 LSCplus lyophilizer as well as sucrose-gelatin protective medium were used in the work.

RESULTS. The experiments established the optimal parameters for lyophilic drying of microorganisms at low concentrations (10^3 CFU/mL) in chamber-type devices: freezing to minus 25 °C, primary drying at a shelf temperature of minus 35 °C and a vacuum of 0.4 mbar for 8 h, and final drying for 4 h at a temperature of 30 °C and a residual pressure of 0.001 mbar. When using this mode, the survival rate of test strains at low concentrations ranged from 22 to 100% depending on the type of microorganism. The quality of the samples obtained was assessed using the parameter loss of drying which varied from 0.8 to 2.1%.

CONCLUSIONS. The proposed drying mode allows preserving the number of viable cells of microorganisms standardized at low concentrations using chamber-type lyophilic equipment. Freezing below the eutectic temperature may reduce survival of microbial cells after drying, as shown for *A. faecalis* strain 415. The survival of a set of eight microorganisms at low concentrations after lyophilization has been assessed for the first time in Russia.

Keywords: lyophilization; test strains; freezing; primary drying; drying; sublimation

For citation: Voropaev A.A., Krysanova Yu.I., Fadeikina O.V., Valyukhova R.M., Davydov D.S. Lyophilization of microorganisms standardized by the number of viable cells in low concentration: Development of a drying mode. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(2):193–202. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-193-202>

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. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. O.V. Fadeikina has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2025. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных задач Государственной коллекции микроорганизмов является пополнение, поддержание и обеспечение заинтересованных учреждений, в том числе производителей лекарственных препаратов, типовыми и референсными тест-штаммами микроорганизмов [1]. Последние широко используются при проверке ростовых свойств питательных сред, оценке работы оборудования, валидации методик, при проведении микробиологических испытаний, а также при контроле качества работы лаборатории и подтверждении компетентности лабораторий на соответствие ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 [2].

Лиофилизированные образцы тест-штаммов микроорганизмов являются лучшим выбором как для долгосрочного хранения, так и для транспортирования, что позволяет сохранить микроорганизмы в жизнеспособном состоянии. Для упрощения работы микробиологических лабораторий и увеличения точности проведения испытаний целесообразно использовать образцы лиофилизированных тест-штаммов микроорганизмов, готовых к использованию сразу после растворения и исключающих проведение дополнительных манипуляций по культивированию и приготовлению серийных разведений. Готовые к использованию образцы тест-штаммов должны содержать стандартизированное количество живых микробных клеток в концентрации 10^3 КОЕ/мл.

Существует немало работ, посвященных выбору оптимальных условий высушивания и культивирования микроорганизмов перед высушиванием [3–6] или выбору оптимальных лиопротекторов [7–10], но все они касаются высушивания микроорганизмов в высоких концентрациях (10^7 – 10^{12} КОЕ/мл). Известно, что высокая концентрация клеток способствует лучшей выживаемости микроорганизмов при высушивании [11, 12]. Таким образом, условия высушивания микроорганизмов в концентрации 10^7 – 10^{12} КОЕ/мл нельзя напрямую экстраполировать на подготовку лиофилизатов микроорганизмов в низкой концентрации.

Ранее нами были определены параметры лиофильного высушивания с применением аппарата коллекторного типа и по результатам проведенной работы разработаны несколько режимов высушивания коллекционных штаммов в ампулах [13]. При использовании аппарата данного типа можно контролировать только время высушивания. Современное лиофильное оборудование камерного типа позволяет контролировать практически все параметры процесса: температуру замораживания и нагревания образцов, время каждого этапа и глубину вакуума в камере. Таким образом, при оптимизации режима высушивания можно улучшить качество готового лиофилизированного продукта.

Обычно в режиме лиофильного высушивания выделяют три этапа: замораживание, первичное высушивание и досушивание [14].

Замораживание – первый и важнейший этап лиофилизации для всего цикла высушивания [15]. Замораживание сложных растворов, содержащих лиопротекторы (сахароза), проходит по механизму стеклования. При замораживании растворов, содержащих воду и растворенные в ней вещества, происходит их эвтектическое разделение. Оно заключается в том, что замерзает чистая вода (кристаллизация), а вещества концентрируются в незамерзающей части до тех пор, пока раствор не достигнет эвтектической концентрации. Температура, при которой достигается максимальная концентрация данного вещества и происходит замораживание всего раствора, называется эвтектической точкой.

При замерзании чистой воды снижается средняя кинетическая энергия молекул, то есть происходит выделение тепла. На графике кристаллизация обозначается моментом резкого нагревания образцов на несколько градусов. Данное значение температуры указывает на начало эвтектической зоны. При этом между кристаллами воды остается жидкая вода, в которой концентрируются растворенные вещества. Присутствие жидкой воды способствует электропроводности, выраженной в низком электрическом сопротивлении [16]. Таким образом, устанавливая температуру замораживания образцов

и анализируя показатели электрического сопротивления, можно контролировать качество конечного лиофилизированного продукта.

Температура замораживания влияет на проницаемость клеточной мембраны, снижая жизнеспособность микроорганизмов [3, 17]. Если температура замораживания будет недостаточно низкой и образцы не полностью замерзнут, то при сублимации такой образец вспенится, что приведет к потере качества конечного продукта. Напротив, слишком низкая температура замораживания существенно увеличивает время высушивания и потребления энергии, а также может привести к снижению выживаемости микроорганизмов при дальнейшем хранении [4].

На втором этапе (первичное высушивание), происходит сублимация воды из лиофилизуемого образца в условиях вакуума. К образцам подводят дополнительную энергию, необходимую для сублимации влаги путем нагревания полки, на которой расположены образцы. Образцы также получают энергию теплового излучения окружающей среды (рис. 1). Крайние флаконы получают больше энергии и их содержимое высыхает быстрее остальных («эффект краевого флакона»).

Третий этап (досушивание или вторичное высушивание) является критическим для лиофилизации, поскольку определяет остаточную влажность образцов. На данном этапе связанная

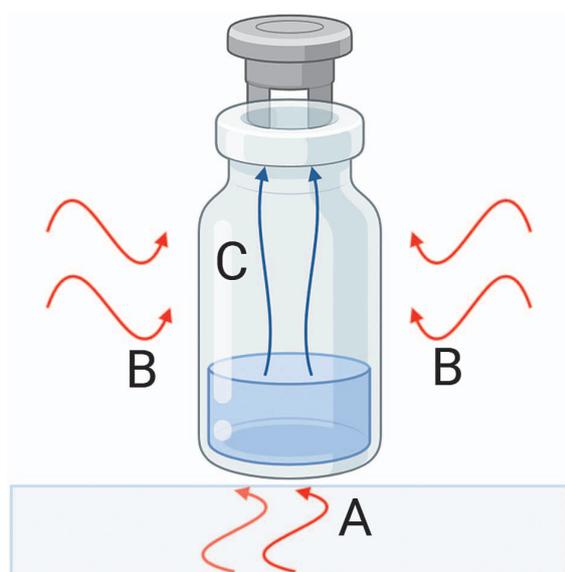


Рисунок подготовлен авторами с использованием графического редактора BioRender / The figure is prepared by the authors using the BioRender graphical editor.

Рис. 1. Тепловая энергия, получаемая лиофилированными образцами: А – от нагревания полки лиофильного аппарата, В – от окружающей среды, С – испарение влаги.

Fig. 1. Thermal energy received by lyophilized samples from heating the shelf of the lyophilizer and the environment, A and B, respectively; C, evaporation of moisture.

вода, оставшаяся адсорбированной в образцах после сублимации, удаляется путем десорбции. Для ее удаления необходимо подвести дополнительную энергию к образцам, что достигается нагреванием полки и максимальным снижением давления в камере. При досушивании необходимо достигнуть остаточной влажности 1–3% для предотвращения химической деградации и физического разрушения структуры лиофилизата.

Суммируя вышесказанное: для получения образцов тест-штаммов, содержащих низкую концентрацию клеток, важно разработать специальный режим высушивания, который будет способствовать сохранению жизнеспособности максимального исходного количества клеток микроорганизмов.

Цель работы – разработка режима высушивания с использованием аппарата камерного типа, обеспечивающего выживаемость тест-штаммов микроорганизмов, стандартизированных по количеству жизнеспособных клеток в концентрации 10^3 КОЕ/мл.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе применяли тест-штаммы микроорганизмов, рекомендованные к проведению микробиологических испытаний Государственной фармакопеей Российской Федерации XV изд.: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NCTC 6017; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и 6538P; *Alcaligenes faecalis* 415; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610; *Escherichia coli* ATCC 25922. Все штаммы получены из основного фонда Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Питательная среда ГРМ-агар (серия О1-К-755) получена от ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора. В качестве лиопротектора использовали сахарозо-желатиновую среду, которая содержала по массе 10% сахарозы (кат. № 1.07653, серия K48546153, Merck, Франция) и 1,5% желатина (кат. № 1.04070, серия VM918570, Merck, Франция). В работе также использовали фармакопейный стандартный образец (ФСО) Государственной фармакопеи Российской Федерации мутности бактериальных взвесей 10 МЕ ФСО 3.1.00084 (ОСО 42-28-84, серия S-2/8-010122, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) (далее – ФСО мутности бактериальных взвесей). Подготовленную бактериальную суспензию разливали во флаконы для лиофилизации объемом 2,0 мл из боросиликатного стекла стандарта 2R (артикул 1637441, серия 6106541118, Shott, Германия).

Оборудование

В работе использовали следующее оборудование: сушику лиофильную Epsilon 2-4 LSCplus с датчиками измерения температуры и электрического сопротивления LioRx (Martin Christ, Германия); весы специальные класса 1 ML204T/A00 (Mettler Toledo, Швейцария); генератор плазмы PG 1200 (Fergutec, Нидерланды); вакуумно-сушильный шкаф VD 23 (Binder, Германия); термостат MIR254 (Panasonic Healthcare Co., Ltd, Япония); шкаф ламинарный БАВ п-01-1,2, класс защиты II (ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

Методы

Температуру замораживания образцов, помещенных в лиофильный аппарат, определяли посредством измерения электрического сопротивления с помощью датчика LioRx и температурного датчика, входящих в комплект лиофильной сушилки Epsilon 2-4 LSCplus. В момент замораживания температура образца снижается, а электрическое сопротивление резко возрастает из-за снижения подвижности ионов в момент перехода из жидкого в твердое состояние. Анализируя график замораживания флаконов в лиофильной сушилке, за точку замерзания можно принять пересечение кривых электрического сопротивления и температуры.

Оценку выживаемости микробных клеток после замораживания и лиофилизации проводили путем культивирования тест-штаммов при 37 ± 2 °C на поверхности агаризованной среды в чашках Петри. Для лиофильного высушивания использовали суточную культуру микроорганизмов. Колонии отбирали бактериологической петлей и готовили в стерильной воде суспензию, соответствующую 10 МЕ ФСО мутности бактериальных взвесей. Полученную суспензию путем последовательных десятикратных разведений в сахарозо-желатиновой среде доводили до концентрации 10^3 КОЕ/мл микробных клеток и вносили по 0,5 мл во флаконы. Для определения концентрации микробных клеток проводили посев суспензии в объеме 0,1 мл на поверхности агаризованной среды в чашках Петри.

Флаконы с суспензией (флаконы) помещали в лиофильную сушилку и замораживали в течение 2 ч при температуре полки минус 35, 45 и 55 °C. По окончании замораживания, непосредственно перед первичным высушиванием, отбирали по 3 образца каждого штамма и размораживали в термостате при температуре 37 °C в течение 30 мин, а затем проводили посев. Оставшиеся флаконы высушивали при температуре полки

минус 20 °C и вакууме 0,4 мбар в течение 10 ч. Затем флаконы досушивали при температуре 30 °C и вакууме 0,006 мбар в течение 4 ч. По окончании лиофилизации определяли количество жизнеспособных клеток и рассчитывали показатель выживаемости, выраженный как отношение количества жизнеспособных клеток после высушивания к исходному количеству клеток.

Определение условий первичного высушивания весовым методом. Критерием первичного высушивания служило изменение массы образцов вследствие удаления воды при сублимации. Массу образца в каждом флаконе рассчитывали по разнице между массой флакона с образцом и массой пустого флакона. Для оценки влияния глубины вакуума проводили три цикла сублимации при давлении 0,4, 0,04 и 0,004 мбар. Высушивание завершали через 5 ч, после чего взвешивали флаконы и рассчитывали массу сублимированной влаги и скорость сублимации образцов.

Определение времени досушивания. Образцы замораживали и проводили сублимацию, как указано выше. Затем в камере создавали минимальное возможное давление, а температуру полки повышали до 30 °C. После нагрева полки образцы отбирали каждый час (6 временных точек) и определяли остаточную влажность образцов по потере в массе при высушивании.

Определение потери в массе при высушивании проводили согласно ОФС.1.2.1.0010.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации¹. Для определения потери в массе при высушивании использовали 20 флаконов, из содержимого которых формировали три навески. Высушивание проводили при температуре 60 °C и давлении менее 7 гПа.

Статистическая обработка результатов включала в себя расчет среднего значения измеряемого параметра, стандартного отклонения от среднего значения и относительного стандартного отклонения с помощью программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение температуры замораживания

На графике замораживания сахарозо-желатиновой среды (рис. 2) можно выделить несколько стадий. На первой стадии защитная среда охлаждается и температура постепенно снижается до точки замерзания воды и начала образования первых кристаллов льда. Лиопротекторы (сахароза и желатин) понижают точку замерзания ниже 0 °C. Как следует из графика (рис. 2),

¹ ОФС 1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

данная среда замерзает при температуре минус 9,9 °С. Процесс кристаллизации является экзотермическим, поэтому происходит нагрев образца до минус 1,6 °С. При кристаллизации электрическое сопротивление резко повышается, но не достигает 100%, так как проходит процесс стеклования раствора (постепенный переход в твердую фазу без кристаллизации). Начинается вторая стадия – стеклование образца, когда он становится более вязким, пока не затвердеет полностью. По достижении температуры образца ниже минус 25 °С электрическое сопротивление достигает 100% (табл. 1). Таким образом, при лиофилизации замораживание необходимо проводить до температуры образца ниже минус 25 °С. Разница температуры полки и лиофилизованного продукта составляет 10 °С. Поэтому для замораживания образцов температура полки должна составлять минус 35 °С.

Влияние температуры замораживания на выживаемость тест-штаммов микроорганизмов

Результаты оценки влияния температуры замораживания на жизнеспособность тест-штаммов микроорганизмов после замораживания и лиофилизации представлены в таблице 2. При температуре ниже минус 40 °С количество жизнеспособных клеток штамма *A. faecalis* 415 уменьшается, хотя для двух других штаммов, *S. Abony* NCTC 6017 и *S. aureus* ATCC 6538, различия незначительны. Это объясняется тем, что микроорганизмы, содержащие

жгутики и не ферментирующие трегалозу, такие как *A. faecalis*, имеют более низкую выживаемость после лиофилизации [18]. Поэтому для лиофилизации образцов выбрана температура минус 25 °С при температуре полки лиофильного аппарата минус 35 °С.

Определение условий первичного высушивания

При температуре полки минус 20 °С отсутствует плавление защитной среды. Небольшое плавление наблюдается при температурах минус 15 и минус 10 °С. Скорость сублимации при температурах полки минус 15 и минус 20 °С одинаковая. Поэтому оптимально проводить высушивание при температуре полки минус 20 °С, так как отсутствует вероятность плавления образцов.

После определения температуры нагрева полки оценили влияние глубины вакуума на скорость сублимации. При понижении давления скорость высушивания снижается, увеличивая общее время сублимации. Результаты эксперимента приведены в таблицах 3 и 4. Таким образом, оптимально было использовать остаточное давление в камере на уровне 0,4 гПа.

После определения условий первичного высушивания рассчитали скорость высушивания образцов в зависимости от расположения в камере лиофильного аппарата при его полной загрузке (рис. 3). Процесс сублимации протекает линейно, происходит постепенное углубление зоны высушенного образца [1]. Из рисунка 3 следует, что процесс продолжался в течение 8 ч,

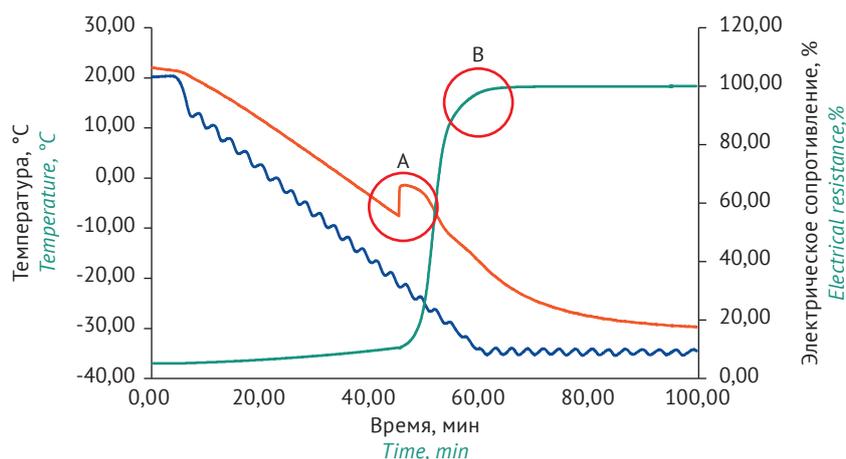


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным с использованием программного обеспечения LioLog к оборудованию Epsilon 2-4 LSCplus / The figure is prepared by the authors using their own data and software LioLog to the Epsilon 2-4 LSCplus equipment

Рис. 2. График замораживания сахарозо-желатиновой защитной среды: красная линия – температура образцов; зеленая линия – электрическое сопротивление LioRx, синяя линия – температура полки. Красными кругами на рисунке выделены: А – момент кристаллизации образцов; В – момент достижения 100% электрического сопротивления LioRx.

Fig. 2. A graph of sucrose-gelatin protective medium freezing: red line, sample temperature; green line, electrical resistance LioRx; blue line, shelf temperature. Red circles highlight points of crystallization of samples and reaching 100% electrical resistance LioRx, A and B, respectively.

Таблица 1. Характеристики замораживания сахарозо-желатиновой среды при определении зоны эвтектики
Table 1. Characteristics of sucrose-gelatin medium freezing while determining the eutectic zone

Температура полки, °C <i>Shelf temperature, °C</i>	Температура образца, °C <i>Sample temperature, °C</i>	Электрическое сопротивление LioRx, % <i>Electrical resistance LioRx, %</i>
Минус 20 / -20	Минус 10 / -10	84,00±1,00
Минус 30 / -30	Минус 20 / -20	99,50±0,10
Минус 30 / -30	От минус 23 до минус 25 <i>From -23 to -25</i>	99,99±0,01
Минус 35 / -35	От минус 25 до минус 26 <i>From -25 to -26</i>	100,00±0,01

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

Таблица 2. Влияние температуры замораживания на выживаемость тест-штаммов микроорганизмов
Table 2. Effect of freezing temperature on the survival rate of test strains of microorganisms

Тест-штамм <i>Test strain</i>	Условия <i>Conditions</i>	Выживаемость, % / <i>Survival rate, %</i>		
		Температура образца, °C / <i>Sample temperature, °C</i>		
		Минус 25 -25	Минус 35 -35	Минус 45 -45
S. Abony NCTC 6017	Замораживание / <i>Freezing</i>	96±6 ^a	100±6	95±1
	Лиофилизация / <i>Lyophilization</i>	83±8	62±6	69±7
S. aureus ATCC 6538	Замораживание / <i>Freezing</i>	100±7	94±8	100±1
	Лиофилизация / <i>Lyophilization</i>	68±18	68±15	58±17
A. faecalis 415	Замораживание / <i>Freezing</i>	100±14	92±11	96±8
	Лиофилизация / <i>Lyophilization</i>	54±9	50±10	15±5

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

Примечание. \bar{X} – среднееарифметическое значение, S – стандартное отклонение; n – число испытаний.

^a данные представлены как $\bar{X} \pm S$ (n=9).

Note. \bar{X} , arithmetic mean, S, standard deviation; n, a number of tests.

^a data represented as $\bar{X} \pm S$ (n=9).

Таблица 3. Характеристика первичного высушивания образцов при разной температуре полок
Table 3. Characteristics of the primary drying of samples at different shelf temperatures

Температура полки, °C <i>Shelf temperature, °C</i>	Электрическое сопротивление LioRx, % <i>Electrical resistance LioRx, %</i>	Температура образца, °C <i>Sample temperature, °C</i>	Скорость сублимации, мг/ч <i>Sublimation rate, mg/h</i>	Время, необходимое для высушивания 0,5 мл, ч <i>Time required for drying of 0.5 mL, h</i>
Минус 10 -10	99,88–99,99	Минус 23,8 – минус 26,6 <i>From -23.8 to -26.6</i>	65	11,5
Минус 15 -15	99,93–99,99	Минус 21,3 – минус 24,4 <i>From -21.3 to -24.4</i>	34	13,5
Минус 20 -20	100	Минус 24,5 – минус 25,9 <i>From -24.5 to -25.9</i>	34	13,5

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

после чего останавливался. Затем переходили к следующему этапу – досушиванию.

Определение времени досушивания

В предыдущих исследованиях нами было определено, что продолжительность досушивания не оказывает влияния на выживаемость S. Abony, S. aureus и A. faecalis после лиофилиза-

ции и последующем хранении [13]. При определении потери в массе при высушивании остаточная влажность нормируется в диапазоне от 0 до 3%. В качестве критерия окончания времени досушивания была выбрана середина диапазона (1,5%), но не менее 0,5%, так как слишком низкая остаточная влажность может привести к снижению выживаемости клеток микроорганизмов

Таблица 4. Масса сублимированной влаги при разном давлении
Table 4. The mass of sublimated moisture at different pressures

Остаточное давление в камере лиофильной сушки, гПа <i>Residual pressure in the freeze-drying chamber, gPa</i>	Потеря в массе при сублимации, мг <i>Weight loss during sublimation, mg</i>	Остаточная масса лиофилизата, % <i>Residual weight of lyophilizate, %</i>
0,4	455±18 ^a	9
0,04	307±18	39
0,004	240±9	52

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

Примечание. \bar{X} – среднееарифметическое значение; S – стандартное отклонение; n – число испытаний.

^a данные представлены как $\bar{X} \pm S$ ($n=10$).

Note. \bar{X} , arithmetic mean; S , standard deviation; n , a number of tests.

^a data represented as $\bar{X} \pm S$ ($n=10$).

за счет удаления связанной воды и денатурации белковых структур. Такая остаточная влажность достигается за 4 ч досушивания при 30 °С (рис. 4).

Таким образом, по результатам проведенных исследований можно предложить режим высушивания тест-штаммов микроорганизмов в аппарате камерного типа с параметрами, указанными в таблице 5.

Подобранный режим высушивания верифицировали на нескольких сериях образцов разных тест-штаммов микроорганизмов в концентрации 10³ КОЕ/мл (табл. 6). В каждой серии отмечалось высокое качество лиофилизата: ровная белая таблетка, растворяющаяся в течение 30 с в 0,5 мл стерильной воды очищенной. При культивировании каждого тест-штамма наблюдались типичные колонии, соответствующие морфологическим свойствам данного штамма.

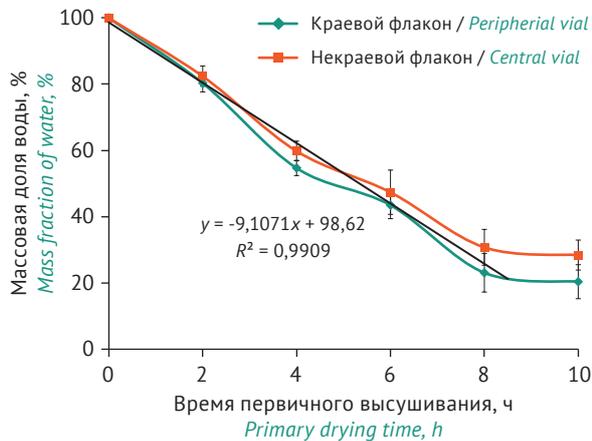


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. График скорости высушивания в зависимости от расположения флаконов в лиофильном аппарате: линия зеленого цвета (ромбы) – флаконы, расположенные по краям; линия красного цвета (квадраты) – флаконы, расположенные в центре аппарата; линия черного цвета – кривая аппроксимации.

Fig. 3. A graph of drying speed depending on the location of the vials in the freeze dryer: vials located at the peripheral and in the central parts of the device are shown in green and red colors, respectively; an approximation curve is shown in black color.

Выживаемость грамположительных бактерий после лиофилизации оказалась выше, чем грамотрицательных, что, возможно, связано со строением клеточной стенки. Результаты оценки выживаемости совпадают с результатами исследований патентованных микроорганизмов в депозитариях Японии [19] и ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора [18], однако описанное в этих работах высушивание проводили в условиях высокой концентрации клеток. Установленное нами сходство данных оценки выживаемости клеток микроорганизмов, взятых для высушивания в высоких и низких концентрациях, указывает на то, что выживаемость является видоспецифическим признаком, а разработанный режим высушивания может быть использован для лиофилизации стандартизированных по количеству жизнеспособных клеток микроорганизмов.

Проведенное исследование подчеркивает важность оптимизации условий лиофилизации, поскольку выбор параметров процесса влияет на выживаемость микроорганизмов.

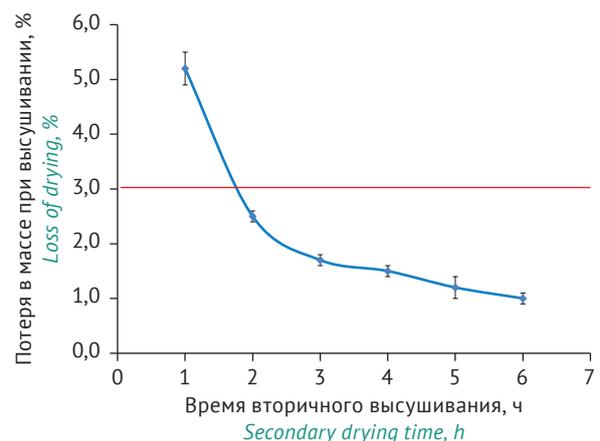


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Изменение остаточной влажности образцов в зависимости от времени досушивания. Красным цветом обозначено критическое значение остаточной влажности.

Fig. 4. Dynamics of residual moisture content of the samples depending on the drying time. The critical value of residual moisture content is shown in red color.

Таблица 5. Параметры разработанного режима высушивания для флаконов 2R, заполненных суспензией микробных клеток в объеме 0,5 мл

Table 5. Parameters of developed drying mode for 2R vials filled with 0.5 mL microbial cell suspension

Стадия лиофилизации <i>Lyophilization stage</i>	Продолжительность экспозиции, ч <i>Exposition duration, h</i>	Температура полок, °C <i>Shelf temperature, °C</i>	Вакуум в камере, мбар <i>Vacuum in the freeze-drying chamber, mbar</i>
Загрузка <i>Loading</i>	0	20	–
Замораживание <i>Freezing</i>	1	Минус 35 / -35	–
	1	Минус 35 / -35	–
Первичная сушка <i>First drying</i>	10	Минус 20 / -20	0,4
	1	30	0,4
Досушивание <i>Final drying</i>	4	30	0,001
Общее время <i>The total time</i>	17	Не применимо / <i>Not applicable</i>	

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

Таблица 6. Оценка качества лиофилизатов, полученных по разработанному режиму высушивания

Table 6. Evaluation of the quality of lyophilisates obtained according to the developed drying mode

Тест-штамм <i>Test strain</i>	Выживаемость после высушивания, % <i>Survival after drying, %</i>	Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss of drying, %</i>
<i>A. faecalis</i> 415	40	0,8
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	96	1,5
<i>S. Abony</i> NCTC 6017	83	1,5
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	89	2,1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	40	1,0
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	22	1,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	41	1,2
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	100	1,9

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

Замораживание ниже температуры стеклования приводит к снижению жизнеспособности некоторых штаммов. Увеличение глубины вакуума не ускоряет процесс высушивания, а продлевает время сублимации. Таким образом, описанный подход к определению параметров лиофильного высушивания может быть использован для оптимизации цикла лиофилизации при создании и поддержании коллекций микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

1. Разработан режим лиофильного высушивания тест-штаммов микроорганизмов в низкой концентрации (10^3 КОЕ/мл), включающий замораживание до температуры не выше минус

25 °C, первичное высушивание при температуре полки минус 35 °C и вакууме 0,4 мбар, а также досушивание при 30 °C и остаточном давлении 0,001 мбар.

2. Выживаемость тест-штаммов микроорганизмов зависит от температурного режима замораживания: температура замораживания ниже эвтектической точки может снижать жизнеспособность микроорганизмов, особенно *A. faecalis*.
3. Полученные результаты исследования могут быть положены в основу стандартизации процесса лиофилизации тест-штаммов микроорганизмов в рамках фармакопейных требований и микробиологического контроля.

Литература/References

1. Díaz-Rodríguez AM, Salcedo Gastelum LA, Félix Pablos CM, Parra-Cota FI, Santoyo G, Puente ML, et al. The current and future role of microbial culture collections in food security worldwide. *Front Sustain Food Syst.* 2020;4:614739. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.614739>
2. Han-Min O. Selection of bacterial strains in a testing microbiology laboratory for quality assurance purposes: ISO/IEC 17025:2017 standard point of view. *Accred Qual Assur.* 2025; 30:95–101. <https://doi.org/10.1007/s00769-024-01615-9>
3. Rockinger U, Funk M, Winter G. Current approaches of preservation of cells during (freeze-) drying. *J Pharm Sci.* 2021; 110(8):2873–93. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.04.018>
4. Polo L, Mañes Lázaro R, Olmeda I, Cruz Pio LE, Medina A, Ferrer S, Pardo I. Influence of freezing temperatures prior

- to freeze drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. *J Appl Microbiol.* 2017;122(6):1603–14. <https://doi.org/10.1111/jam.13465>
5. de Almeida KV, Zanetti VC, Camelo-Silva C, Alexandre LA, da Silva AC, Verruck S, Teixeira LJQ. Powdered water kefir: Effect of spray drying and lyophilization on physical, physicochemical, and microbiological properties. *Food Chem Adv.* 2024;5:100759. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100759>
 6. Dimitrellou D, Kandylis P, Kourkoutas Y. Effect of cooling rate, freeze-drying, and storage on survival of free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393. *LWT – Food Sci Technol.* 2016;69:468–73. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.063>
 7. Verlhac P, Vessot-Crastes S, Degobert G, Cogné C, Andrieu J, Beney L, et al. Experimental study and optimization of freeze-drying cycles of a model *Casei* type probiotic bacteria. *Dry Technol.* 2020;38(16):2120–33. <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1683859>
 8. Guowei S, Yang X, Li C, Huang D, Lei Z, He C. Comprehensive optimization of composite cryoprotectant for *Saccharomyces boulardii* during freeze-drying and evaluation of its storage stability. *Prep Biochem Biotechnol.* 2019;49(9):846–57. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1630649>
 9. Bellali S, Bou Khalil J, Fontanini A, Raoult D, Lagier JC. A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiol Res.* 2020;236:126454. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126454>
 10. Явников НВ. Влияние различных криопротекторных компонентов на выживаемость пробиотических микроорганизмов после лиофильной сушки. *Международный вестник ветеринарии.* 2022;(1):69–73. Yavnikov NV. The effect of various cryoprotective components on the survival of probiotic microorganisms after freeze drying. *International Journal of Veterinary Medicine.* 2022;(1):69–73 (In Russ.). <https://doi.org/10.52419/issn2072-2419.2022.1.69>
 11. Manohar P, Ramesh N. Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages. *Sci Rep.* 2019; 9(1):15242. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51742-4>
 12. Schoug A, Olsson J, Carlfors J, Schnürer J, Håkansson S. Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3-effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. *Cryobiology.* 2006; 53(1):119–27. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.04.003>
 13. 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>
 14. Ward KR, Matejtschuk P. The principles of freeze-drying and application of analytical technologies. In: Wolkers WF, Oldenhof H, eds. *Cryopreservation and freeze-drying protocols. Methods in Molecular Biology.* Vol. 2180. New York: Humana; 2021. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_3
 15. Assegehegn G, Brito-de la Fuente E, M. Franco J, Gallegos C. The importance of understanding the freezing step and its impact on freeze-drying process performance. *J Pharm Sci.* 2019;108(4):1378–95. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.11.039>
 16. Sohail Arshad M, Smith G, Polygalov E, Ermolina I. Through-lyal impedance spectroscopy of critical events during the freezing stage of the lyophilization cycle: The example of the impact of sucrose on the crystallization of mannitol. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;87(3):598–605. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.05.005>
 17. Wang G-Q, Pu J, Yu X-Q, Xia Y-J, Ai L-Z. Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *J Dairy Sci.* 2020; 103(4):3066–75. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17685>
 18. 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>
 19. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J Gen Appl Microbiol.* 2008;54(1):9–24. <https://doi.org/10.2323/jgam.54.9>

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; **Ю.И. Крысанова** – проведение экспериментальной работы; **О.В. Фадейкина** – участие в формулировке выводов, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **Р.М. Валухова** – проведение экспериментальной работы, написание текста рукописи; **Д.С. Давыдов** – концепция работы, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.A. Voropaev** conceptualized the work, conducted the experiments, drafted the manuscript, and compiled the conclusions. **Yu.I. Krysanova** conducted the experiments. **O.V. Fadeikina** compiled the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication. **R.M. Valukhova** conducted the experimental work and drafted the manuscript. **D.S. Davydov** conceptualized the work 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>

Крысанова Юлия Игоревна / Yulia I. Krysanova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8893-0621>

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук / Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

Валухова Рузилья Маратовна / Ruzilya M. Valukhova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8389-3058>

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук / Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>

Поступила 25.11.2024

После доработки 29.04.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Received 25 November 2024

Revised 29 April 2025

Accepted 6 June 2025



Пробиотические свойства композиции индигенных штаммов *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 и *Bifidobacterium longum* ICIS-505 в условиях *in vitro*

Н.Б. Перунова^{1,2}✉, О.В. Бухарин¹, Е.В. Иванова¹, А.В. Бекпергенова¹, Т.А. Бондаренко¹

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук – обособленное структурное подразделение федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, ул. Пионерская, д. 11, г. Оренбург, 460000, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Одесская, д. 54, г. Тюмень, 625023, Российская Федерация

✉ Перунова Наталья Борисовна; nbperunova@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Активный поиск пробиотических штаммов микроорганизмов, в том числе относящихся к индигенным штаммам бифидобактерий, является важной задачей при создании лечебно-профилактических пробиотических препаратов. При определении пробиотического потенциала кандидатных штаммов необходима их оценка по показателям жизнеспособности бактерий, чувствительности к антибиотикам, устойчивости к желудочному соку и желчи, лизоцимрезистентности и биоупорядочиванию.

ЦЕЛЬ. Характеристика композиции индигенных штаммов *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 и *Bifidobacterium longum* ICIS-505 в качестве потенциального пробиотического препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Использованы штаммы *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505. Оценивали чувствительность штаммов к антибиотикам, а также устойчивость к желудочному соку и желчи. Проводили исследование монокультур бифидобактерий *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 и их композиции по количеству жизнеспособных клеток при культивировании, антилизоцимной активности (лизоцимрезистентности), биоупорядочиванию. При определении антагонистической активности в качестве тест-штаммов условно-патогенных и патогенных культур использовали *Candida albicans* ATCC 24433, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Klebsiella pneumoniae* ICIS-278_PBV. Содержание уксусной кислоты в среде культивирования определяли методом газожидкостной хроматографии.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Отобранные по критериям численности, лизоцимрезистентности и биоупорядочивания индигенные штаммы *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 не имели генов патогенности, обладали устойчивостью к ряду антимикробных препаратов (бензилпенициллин, стрептомицин и эритромицин) и сохраняли свою жизнеспособность в присутствии желчи в течение 2 ч и желудочного сока – 30 мин. Исследуемые культуры бифидобактерий обладали биосовместимостью: в композиции штаммов через 48 ч количество микробных клеток было выше, чем в монокультурах. При совместном культивировании штаммы *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 проявляли синергетический эффект, повышая уровень лизоцимрезистентности до $2,2 \pm 0,30$ мкг/мл \times ОП₄₅₀, биоупорядочивания до $0,89 \pm 0,20$ ед. ОП₆₃₀ и продукцию ацетата до 33,2 мМ/л. Композиция бифидобактерий обладала более выраженной антагонистической активностью по отношению к тест-штаммам бактерий и грибов (зоны угнетения роста тест-культур 30–36 мм) в сравнении с монокультурами (зоны угнетения роста тест-культур 18–24 мм).

ВЫВОДЫ. Индигенные штаммы *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 устойчивы к антимикробным препаратам, желчи и желудочному соку. При совместном культивировании штаммов выявлен синергетический эффект в отношении усиления показателей лизоцимрезистентности, биопленкообразования и антагонистической активности. Исследованные штаммы бифидобактерий и их композиция перспективны с целью создания новых пробиотических препаратов. Оценка лизоцимрезистентности и биопленкообразования может быть рекомендована в качестве показателей адаптивного потенциала микробиоты при отборе и тестировании пробиотических штаммов.

Ключевые слова: индигенные штаммы бифидобактерий; *Bifidobacterium bifidum*; *Bifidobacterium longum*; пробиотик; пробиотические свойства; лизоцимрезистентность; биопленкообразование; антибиотикорезистентность; устойчивость к желудочному соку; устойчивость к желчи; антагонистическая активность

Для цитирования: Перунова Н.Б., Бухарин О.В., Иванова Е.В., Бекпергенова А.В., Бондаренко Т.А. Пробиотические свойства композиции индигенных штаммов *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 и *Bifidobacterium longum* ICIS-505 в условиях *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(2):203–213. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-565>

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР по теме государственного задания Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН «Исследование симбиотических систем про- и эукариот в биологии и медицине» № 122020100106-5.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Probiotic properties of an indigenous strain composition of *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 and *Bifidobacterium longum* ICIS-505 *in vitro*

Natalia B. Perunova^{1,2}✉, Oleg V. Bukharin¹, Elena V. Ivanova¹, Anastasia V. Bekpergenova¹, Taisia A. Bondarenko¹

¹ Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 11 Pionerskaya St., Orenburg 460000, Russian Federation

² Tyumen State Medical University, 54 Odesskaya St., Tyumen, 625023 Russian Federation

✉ Natalia B. Perunova; nbperunova@yandex.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. An active search for probiotic strains of microorganisms, particularly indigenous bifidobacteria, is crucial for the development of therapeutic and prophylactic probiotics. Evaluating the probiotic potential of candidate strains requires their assessment for bacterial viability, antibiotic sensitivity, gastrointestinal stress tolerance, lysozyme resistance, and biofilm formation capacity.

AIM. This study aimed to characterise a composition of indigenous *Bifidobacterium* strains, *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505, as a potential probiotic product.

MATERIALS AND METHODS. The study tested *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 for resistance to antibiotics, gastric acid, and bile. Mono- and co-cultures of *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 were tested for the number of viable cells during culture, antilysozyme activity (lysozyme resistance), and biofilm formation capacity. Antagonistic activity was tested against test strains of bacteria and fungi, including *Candida albicans* ATCC 24433, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, and *Klebsiella pneumoniae* ICIS-278_PBV. The content of acetic acid in the culture medium was determined by gas–liquid chromatography.

RESULTS. The indigenous strains, *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505, were selected according to the criteria of abundance, lysozyme resistance, and biofilm formation. These strains were found to lack pathogenicity genes, exhibit resistance to a number of antimicrobials (benzylpenicillin, streptomycin, and erythromycin), and remain viable in the presence of

bile for 2 hours and in the presence of gastric acid for 30 minutes. The study demonstrated the biocompatibility of *Bifidobacterium* cultures, with the composition of *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 having a higher microbial cell count after 48 hours than monocultures. When co-cultured, *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 demonstrated a synergistic effect, resulting in increased lysozyme resistance (up to $2.2 \pm 0.30 \mu\text{g/mL} \times \text{OD}_{450}$), biofilm formation (up to $0.89 \pm 0.20 \text{OD}_{630}$ units), and acetate production (up to 33.2 mM/L). The antagonistic activity against test strains was more pronounced in the co-culture than in the monocultures, with the respective growth inhibition zones of 30–36 mm and 18–24 mm.

CONCLUSIONS. Indigenous *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 have demonstrated resistance to antimicrobial agents, bile salts, and gastric acid. Co-culturing the strains has revealed a synergistic effect on their lysozyme resistance, biofilm formation capacity, and antagonistic activity. The strains of bifidobacteria and the composition thereof hold promise for the development of novel probiotics. The evaluation of lysozyme resistance and biofilm formation capacity, as indicators of the adaptive potential of the microbiota, may be recommended for the selection and testing of probiotic strains.

Keywords: indigenous *Bifidobacterium* strains; *Bifidobacterium bifidum*; *Bifidobacterium longum*; probiotics; probiotic properties; lysozyme resistance; biofilm formation; antimicrobial resistance; gastric acid resistance; bile resistance; antagonistic activity

For citation: Perunova N.B., Bukharin O.V., Ivanova E.V., Bekpergenova A.V., Bondarenko T.A. Probiotic properties of an indigenous strain composition of *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 and *Bifidobacterium longum* ICIS-505 *in vitro*. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(2):203–213. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-565>

Funding. This study was conducted by the Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, as part of the research and development work under State Assignment No. 122020100106-5 Study of symbiotic systems of pro- and eukaryotes in biology and medicine.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения микробиоты – важный фактор в патогенезе инфекционных и соматических заболеваний. Индигенная (постоянно присутствующая) микробиота человека выступает одним из ключевых компонентов системы физиологической защиты организма человека [1, 2]. Бифидобактерии входят в состав индигенной микробиоты человека [3], являясь одними из немногих симбиотических микроорганизмов, не обладающих патогенными свойствами, отличающихся при этом рядом полезных характеристик [1, 2]. Наличие бифидобактерий в кишечнике человека оказывает влияние на развитие иммунной системы, поддержание кишечного гомеостаза и обеспечение защиты биотопа организма-хозяина от проникновения патогенов [4, 5]. Бифидобактерии активно продуцируют различные биологически активные соединения: витамины, полифенолы, конъюгированные линолевые кислоты, короткоцепочечные жирные кислоты и др. [6]. Многофункциональная роль бифидобактерий в организме человека определила перспективы их использования в качестве основы для пробиотических препаратов [1, 2, 7] и продуктов функционального питания [8].

Пробиотические свойства бифидобактерий штаммоспецифичны и связаны с определенным, уникальным набором биологических

характеристик конкретных штаммов [1, 9], которые оцениваются на этапе отбора культур микроорганизмов [10]. Так как на этапе отбора не всегда учитываются особенности адаптации и выживания микробных культур в организме хозяина и возможность их быстрой элиминации из биотопа кишечника, то это обуславливает в ряде случаев низкую клиническую эффективность применяемых пробиотиков [11]. Одним из способов повышения эффективности пробиотических препаратов является создание микробных консорциумов [12]. Известно, что штаммы бифидо- и лактобактерий могут вступать в конкурентные взаимоотношения как между собой, так и с представителями нормальной микробиоты [13], и лишь транзиторно сохраняются в организме.

В проведенных ранее исследованиях с использованием штаммов из коллекции бифидобактерий лаборатории инфекционной симбиологии Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (ИКВС УрО РАН) были выявлены критерии индигенности микроорганизмов с учетом особенностей их персистенции (адаптации) – длительного выживания микроорганизмов в организме хозяина [3, 14]. Было установлено два стабильных параметра персистенции индигенных микросимбионтов,

определяющих высокий уровень их присутствия в толстом кишечнике человека, – лизоцимрезистентность (ЛР) и биопленкообразование (БПО) [3, 15]. Известно, что процесс формирования биопленок бактериями является универсальным и рассматривается как форма существования микроорганизмов [16].

Указанные параметры могут быть пригодны при отборе индигенных штаммов бифидобактерий для их включения в состав пробиотических препаратов [17], а также при определении уровня биосовместимости штаммов в композиции [18] в контексте создания мультиштаммовых пробиотиков. Важным аспектом при создании пробиотических препаратов является изучение межмикробных взаимодействий используемых культур, которые могут проявлять в отношении друг друга антагонистическую активность или конкурировать за питательные вещества [19].

Цель работы – характеристика композиции индигенных штаммов *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 и *Bifidobacterium longum* ICIS-505 в качестве потенциального пробиотического препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Штаммы бифидобактерий. В работе использовали штаммы *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505, ранее выделенные из испражнений здоровых лиц в лаборатории инфекционной симбиологии ИКВС УрО РАН. Предварительно штаммы бифидобактерий были идентифицированы по культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам [20, 21]. Видовую принадлежность штаммов определяли по масс-спектру белков методом масс-спектрометрии MALDI-TOF MS с помощью системы Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия), а также с использованием высокопроизводительного секвенирования 16S рРНК на платформе MiSeq (Illumina, США). Геномные последовательности штаммов *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 представлены в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank (NBYL000000000¹, RJZF000000000²). Штаммы депонированы в Государственной коллекции нормальной микрофлоры ФБУН «Московский научно-

исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (№ 1258 и 1260 соответственно) и в сетевой коллекции симбиотных микроорганизмов и их консорциумов (СКСМ) ИКВС УрО РАН (№ 00004В и 00005В соответственно).

Тест-штаммы. Для определения антагонистической активности индигенных штаммов использовали культуры из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США) – *Candida albicans* ATCC 24433, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022; коллекции СКСМ ИКВС УрО РАН *Klebsiella pneumoniae* ICIS-278_PBV (DDBJ/ENA/GenBank NCVU000000000.1³; СКСМ ИКВС УрО РАН № 00007В). Для определения лизоцимрезистентности использован штамм *Micrococcus luteus* ATCC 15307 (ATCC, США).

Питательные среды. Бифидум-среда (кат. № О53) и агар бактериологический (кат. № О58) производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (Россия), агар Шадлера (кат. № М291, HiMedia Laboratories, Индия), бульон Шадлера (кат. № М292, HiMedia Laboratories, Индия).

Методы

Аннотация и анализ генома. Аннотацию и первичный анализ генов проводили с использованием онлайн-инструментов RAST⁴. Итоговая аннотация геномов бифидобактерий была выполнена автоматически с помощью сервиса NCBI PGAP (Prokaryotic Genome Annotation Pipeline)⁵ после их депонирования в базе данных NCBI GenBank (NIH, США).

Определение чувствительности к антибиотикам. Чувствительность к антибиотикам *in vitro* определяли диско-диффузионным методом с использованием Бифидум-среды и дисков для оценки антибиотикочувствительности (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Россия)⁶. Для получения плотной питательной среды в Бифидум-среду дополнительно вносили агар бактериологический (15 г/л). Исследовали чувствительность к антимикробным препаратам, относящимся к группам пенициллинов, аминогликозидов, тетрациклинов,

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NBYL000000000>

² <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/RJZF000000000>

³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NCVU000000000>

⁴ <https://rast.nmpdr.org/>

⁵ https://https.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/annotation_prok/

⁶ МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов» (утв. Роспотребнадзором 06.12.2010).

фторхинолонов, макролидов, сульфаниламидов, гликопептидов и фузидина.

Оценка выживаемости бифидобактерий в биологических средах. Для оценки выживаемости использовали имитацию желудочного сока (NaCl – 2,2 г; HCl – 9,9 мл 0,11 М; пепсин свиной – 3,5 ЕД/мл; вода дистиллированная до 1 л, pH 2,8±0,1) и желчь (медицинская консервированная, HiMedia Laboratories, Индия). Монокультуры и композицию штаммов бифидобактерий (10⁸ КОЕ/мл) инкубировали при 37±1 °С в присутствии желудочного сока в течение 30 мин, в присутствии желчи – в течение 2 ч. Контрольные образцы монокультуры и композиции штаммов (10⁸ КОЕ/мл) инкубировали в 0,9% растворе NaCl в течение 30 мин и 2 ч соответственно. Опытные и контрольные образцы монокультуры и композиции штаммов высевали на агар Шадлера и инкубировали в анаэробных условиях при 37±1 °С в CO₂-инкубаторе (Binder, Германия) в течение 48±1 ч.

Определение жизнеспособных бактерий (чашечный метод)⁷. Для определения жизнеспособных клеток монокультур *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 готовили микробную взвесь, соответствующую 0,5 ед. по стандарту МакФарланда (McFarland standard 1×10⁸ КОЕ/мл; кат. № R092; HiMedia Laboratories, Индия). Каждый штамм (1 мл) засеивали в 9 мл бульона Шадлера. Приготовленные по стандарту МакФарланда суспензии двух штаммов, *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 (1 мл), смешивали в соотношении 1:1 и засеивали в 9 мл бульона Шадлера. Монокультуры и смешанную культуру помещали в CO₂-инкубатор при 37±1 °С в течение 0, 24, 48 и 72 ч. После инкубирования культуры перемешивали на шейкере (Heidolph Reax, Германия), проводили серийные разведения, высевали на агар Шадлера и помещали в CO₂-инкубатор при 37±1 °С в течение 48±1 ч. Далее учитывали количество выросших колоний бифидобактерий и определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл. В смешанной культуре штаммы различали по морфотипам, описывая форму колоний. Колонии *B. bifidum* ICIS-310: мелкие (диаметр колонии 1–2 мм), плоские, кремового цвета, округлые. Колонии *B. longum* ICIS-505: более крупные по размеру (диаметр колонии 3–4 мм) и более выпуклые в сравнении с *B. bifidum* ICIS-310, сметанообразные, белые, округлые.

Определение антагонистической активности индигенных штаммов. Антагонистическую активность бифидобактерий в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов оценивали методом отсроченного антагонизма на плотной среде⁸. По 5 мкл суспензии каждого штамма и композиции бифидобактерий (10⁸ КОЕ/мл) пипеткой вносили в центр чашки с агаром Шадлера. После инкубации при 37±1 °С в CO₂-инкубаторе в течение 48±1 ч культуры были обработаны парами хлороформа (100 мкл, 30 мин). Далее на чашку Петри наносили полужидкий агар Шадлера (4,9 мл, 0,7%), предварительно инокулированный тест-штаммами (0,1 мл, 10⁸ КОЕ/мл). После инкубации в течение 18±1 ч при температуре 37±1 °С измеряли диаметр зон задержки роста тест-штаммов (мм). Штаммы бифидобактерий обладали антагонистической активностью по отношению к тест-штаммам при наличии зоны угнетения роста более 10 мм.

Оценка биопленкообразования. Образование биопленок изучали по адгезии микроорганизмов к поверхности 96-луночного полистиролового стерильного планшета [22]. Бифидобактерии культивировали на агаре Шадлера при 37±1 °С в течение 48±1 ч. Затем готовили бактериальную суспензию (10⁸ КОЕ/мл) и добавляли 15 мкл к 135 мкл бульона Шадлера в 96-луночный планшет. В качестве контроля использовали 150 мкл стерильного бульона Шадлера. После инкубации планктонные клетки удаляли встряхиванием, а образование биопленок анализировали с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым (0,1%). Количественную оценку биомассы биопленки проводили путем измерения оптической плотности при 630 нм (ОП₆₃₀) с помощью фотометра ELx 808 (BioTek, США).

Лизоцимрезистентность (антилизоцимная активность). Для определения ЛР бактерий использовали фотометрический метод, описанный в работе О.В. Бухарина [14]. Культуры бифидобактерий выращивали в бульоне Шадлера при 37±1 °С в CO₂-инкубаторе в течение 48±1 ч. Затем измеряли ОП бульонной культуры (ОП₄₅₀) против чистого бульона Шадлера. Полученные бульонные культуры центрифугировали в течение 15 мин при 3200 g, стерилизовали фильтрованием (0,22 мкм, MF-Millipore, Германия) и получали бесклеточные супернатанты бифидобактерий. В качестве тест-штамма

⁷ ОФС.1.7.2.0009.15 Определение специфической активности пробиотиков. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁸ ОФС.1.7.2.0012.15 Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

для определения ЛР использовали ацетонированную агаровую культуру *M. luteus* ATCC 15307. Культуру растворяли в 0,9% растворе NaCl, доводили оптическую плотность до 0,30 (0,28–0,32). Готовили раствор лизоцима (Sigma Aldrich, США) с концентрацией 20 мг/мл в 1/15 М фосфатном буфере (рН 6,2). Опытные пробы готовили из бесклеточного супернатанта бифидобактерий, смешивая с 0,9 и 0,1 мл раствора лизоцима, в контрольных пробах вместо бесклеточного супернатанта использовали питательный бульон. Пробы инкубировали 120 мин при 37±1 °С. Далее проводили определение уровня ЛР культур по степени лизиса суспензии тест-штамма согласно формуле (1):

$$A = \frac{V_1 \times C \times (1 - \Delta D_0 / \Delta D_k)}{V_2 \times Y}, \quad (1)$$

где A – лизоцимрезистентность, выраженная в микрограммах инактивированного лизоцима в 1 мл супернатанта, мг/мл×ОП₄₅₀; V_1 – объем раствора лизоцима исходной концентрации 20 мг/мл (0,1 мл); V_2 – объем бесклеточного супернатанта бульонной культуры исследуемого штамма (0,9 мл); C – исходная концентрация лизоцима (20 мг/мл); Y – ОП бульонной культуры исследуемого штамма, ед. ОП; ΔD_0 – изменение ОП суспензии тест-штамма в опытном образце в временном интервале между 30 и 150 с; ΔD_k – изменение ОП суспензии тест-штамма в контрольном образце между 30 и 150 с.

Содержание уксусной кислоты. Пробы для определения количества уксусной кислоты, продуцируемой штаммами бифидобактерий в монокультуре и композиции, получали при добавлении 1 мл бактериальной суспензии (10⁸ КОЕ/мл) в 9 мл бульона Шадлера (общий объем 10 мл) и помещали в СО₂-инкубатор при температуре 37±1 °С в течение 24–72 ч. Проводили измерение содержания уксусной кислоты в начальной временной точке внесения культур (0 ч), через 24, 48 и 72 ч.

Содержание уксусной кислоты при культивировании штаммов бифидобактерий определяли методом газожидкостной хроматографии⁹ с использованием хроматографа GC-2010 Plus (Shimadzu, Япония); детекцию проводили на пламенно-ионизационном детекторе с капиллярной колонкой HP-FFAP (Agilent Technologies, США), 0,32 мм, 50 м. Условия хроматографирования – температурный режим:

испаритель – 240 °С; детектор – 260 °С; программа для капиллярной колонки: 0 мин – 70 °С; 10 мин – 160 °С; 5 мин – 180 °С; 25 мин – 240 °С. В качестве газа-носителя использовали гелий, скорость потока 21 см/сек, давление в колонке 74 кПа. Для определения количества компонента в пробе применяли метод абсолютной градуировки с предварительным построением калибровочного графика уксусной кислоты (Sigma-Aldrich, США). Концентрацию рассчитывали по площадям пиков с помощью программы GCsolution (Shimadzu, Япония).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, США) и Microsoft Office Excel 2010. Результаты представляли в виде среднего и стандартного отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительный отбор штаммов бифидобактерий и анализ их генома

Предварительно проводили отбор индигенных штаммов бифидобактерий кишечника человека из коллекции лаборатории инфекционной симбиологии (ИКВС УрО РАН, Оренбург). Были отобраны культуры *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505, обладающие выраженными адаптивными свойствами индигенных штаммов по способности выживать в кишечнике человека [3, 17], имеющие высокие показатели микробной обсемененности в кишечнике (9,1 и 10,0 lg КОЕ/г соответственно), лизоцимрезистентности (1,62±0,2 и 1,8±0,2 мг/мл×ОП₄₅₀ соответственно) и биопленкообразования (0,40±0,03 и 0,50±0,05 ед. ОП₆₃₀ соответственно).

Анализ генома штаммов бифидобактерий показал, что суммарная длина геномной последовательности *B. bifidum* ICIS-310 составила 2,21 млн п.н., *B. longum* ICIS-505 – 2,44 млн п.н. По объему генома штаммы можно оценить как находящиеся на уровне верхней границы размеров геномов известных представителей рода *Bifidobacterium* spp. (1,8–2,3 млн п.н.). Число белок-кодирующих генов у *B. bifidum* ICIS-310 составило 1718, у *B. longum* ICIS-505 – 2003.

При аннотации генома *B. bifidum* ICIS-310 выявлено, что самые большие группы генов относились к следующим подсистемным категориям: метаболизм белков (207 генов), аминокислоты и их производные (198 генов) и углеводы (143 гена). Другие значительные категории генома включали: кофакторы, витамины, простетические группы, пигменты (73 гена), компоненты

⁹ МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов» (утв. Роспотребнадзором 06.12.2010).

клеточной стенки (70 генов), системы метаболизма ДНК (65 генов) и РНК (62 гена), метаболизма фосфора (35 генов), жирных кислот, липидов и изопреноидов (28 генов), гены деления клеток и клеточного цикла (26 генов).

В аннотированном геноме штамма *B. longum* ICIS-505 самые большие группы генов относятся к категориям: аминокислоты и их производные (207 генов), системы метаболизма белков (204 гена) и углеводов (189 генов), кофакторы, витамины, пигменты (96 генов), система метаболизма РНК (70 генов), компоненты клеточной стенки (63 гена).

В геноме обоих штаммов *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 выявлен ген *vanZ*, кодирующий белок устойчивости к тейкопланину (гликопептидный антибиотик).

Проведенный анализ генома изучаемых штаммов бифидобактерий показал, что они не имеют генов патогенности и могут быть перспективны для дальнейшего исследования с целью создания пробиотических препаратов.

Исследование пробиотических свойств штаммов *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505

Исследование устойчивости штаммов к действию антибиотиков. При определении устойчивости к действию антибиотиков выявлено, что оба штамма бифидобактерий обладают антибиотикорезистентностью к пенициллину, гентамицину и эритромицину (табл. S1, опубликована на сайте журнала¹⁰). Культура *B. bifidum* ICIS-310 была также устойчива к сульфаниламидам, ванкомицину и фузидину, а штамм *B. longum* ICIS-505 – к фторхинолонам.

Определение уровня экспрессии генов устойчивости к антибиотикам и возможности их передачи от пробиотических штаммов комменсальной микробиоте *in vivo* – важные аспекты при оценке безопасности бактерий для выбора штаммов. Это исключает риск передачи генов резистентности кишечной микробиоте [23]. Долгое время устойчивость молочнокислых бактерий к антимикробным препаратам оценивалась как допустимое свойство [24], и такие штаммы бактерий считались пригодными для использования в производстве пробиотиков и кисломолочных продуктов [25]. Однако недавние исследования показали, что молочнокислые бактерии, являющиеся носителями генов устойчивости к антибиотикам, могут передавать эти гены другим микроорганизмам [26]. Следует отметить, что благодаря генетической удаленности класса актинобактерий, включая бифидобактерии,

от большинства патогенных и условно-патогенных бактерий толстого кишечника, передача детерминант устойчивости к антибиотикам путем горизонтального переноса генов в их случае ограничена [27]. Кроме того, совместное применение пробиотиков и противомикробных препаратов может способствовать эффективно-му восстановлению микробиоценоза толстого кишечника человека на этапе лечения.

В дальнейшем для исключения риска горизонтального переноса генов антибиотикорезистентности между изучаемыми штаммами и патогенной микрофлорой планируется провести анализ на наличие мобильных генетических элементов и плазмид, связанных с устойчивостью к антибиотикам, а также предполагается проведение исследований *in vivo*.

Оценка выживаемости *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 в желудочном соке и желчи.

При отборе перспективных штаммов необходимым параметром оценки является изучение устойчивости бифидобактерий к биологическим секретам человека. Поскольку при прохождении пробиотических бактерий через желудочно-кишечный тракт они подвергаются воздействию желудочного сока и желчи [28], была проведена оценка влияния этих факторов на выживаемость культур бифидобактерий.

Изучение выживаемости штаммов бифидобактерий в желудочном соке и желчи в условиях *in vitro* показало, что количество жизнеспособных клеток в контрольных образцах как в монокультуре, так и в композиции без добавления желудочного сока и желчи составляло не менее 10^8 КОЕ/мл. После инкубации в желудочном соке в течение 30 мин отмечено уменьшение количества клеток обоих штаммов на 3 порядка – до 1×10^5 КОЕ/мл. Полученные данные свидетельствуют об устойчивости штаммов к данному стрессовому фактору. Следует отметить, что в модельных исследованиях при изучении воздействия желудочного сока в отношении современных пробиотических штаммов показано снижение выживаемости клеток на 5–6 порядков [29].

В условиях инкубирования культур бифидобактерий с желчью в течение 2 ч было выявлено уменьшение количества клеток *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 на 3–4 порядка – до $1,1 \times 10^4$ и 1×10^5 КОЕ/мл соответственно.

Определение количества жизнеспособных бактерий *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 в монокультуре и композиции. Анализ количества жизнеспособных клеток *B. bifidum*

¹⁰ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-565-table-s1>

Таблица 1. Динамика изменения количества жизнеспособных клеток в монокультуре бифидобактерий *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 и их композиции

Table 1. Changes in the number of viable cells in mono- and co-cultures of *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 with time

Время культивирования, ч <i>Culture time, h</i>	Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл <i>Number of viable cells, CFU/mL</i>				
	Монокультура <i>Monoculture</i>		Композиция <i>Co-culture</i>		
	<i>B. bifidum</i> ICIS-310	<i>B. longum</i> ICIS-505	<i>B. bifidum</i> ICIS-310	<i>B. longum</i> ICIS-505	ICIS-310 + ICIS-505
0	1,0×10 ⁸	1,0×10 ⁸	3×10 ⁷	7×10 ⁷	1,0×10 ⁸
24	2,7×10 ⁹	3,1×10 ⁸	2,0×10 ⁸	1,3×10 ⁸	3,3×10 ⁸
48	9,9×10 ⁹	10,3×10 ⁹	5,1×10 ⁹	5,6×10 ⁹	10,7×10 ⁹
72	8,4×10 ⁸	9,5×10 ⁸	4,2×10 ⁸	5,6×10 ⁸	9,8×10 ⁸

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

Таблица 2. Показатели биопленкообразования и лизоцимрезистентности монокультур *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 и их композиции

Table 2. Biofilm formation and lysozyme resistance of *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 in mono- and co-cultures

Показатель <i>Parameter</i>	Монокультура <i>Monoculture</i>		Композиция штаммов <i>Co-culture</i>
	<i>B. bifidum</i> ICIS-310	<i>B. longum</i> ICIS-505	
БПО, ед. ОП ₆₃₀ <i>BFF, OD₆₃₀ units</i>	0,40±0,03	0,50±0,05	0,89±0,20*
ЛР, мкг/мл×ОП ₄₅₀ <i>LR, µg/mL×OD₄₅₀</i>	1,62±0,20	1,80±0,20	2,20±0,30*

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

Примечание. БПО – биопленкообразование; ЛР – лизоцимрезистентность; * – достоверные отличия значений относительно монокультур ($p < 0,05$).

Note. BFF, biofilm formation; LR, lysozyme resistance; *, significant differences from monocultures ($p < 0.05$).

ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 в монокультуре и композиции (табл. 1) показал, что при раздельном культивировании количество жизнеспособных бифидобактерий увеличивалось к 48 ч ($p \leq 0,05$). В композиции культур штаммов через 48 ч количество микробных клеток было выше, чем в монокультурах ($p \leq 0,05$). Через 72 ч культивирования количество живых клеток снижалось как в монокультуре, так и в композиции. При расщепе композиции бифидобактерий выявлялись оба штамма. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые штаммы не подавляют рост друг друга при совместном культивировании.

При совместном культивировании *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 проявляли синергетический эффект, усиливая некоторые характеристики друг друга (табл. 2). Для оценки были выбраны показатели БПО и ЛР, которые хотя и не являются обязательными критериями анализа пробиотических культур, но авторы полагают, что их определение имеет важное значение для выявления адаптивного потенциала пробиотиков в организме человека. Было показано, что значения показателей БПО и ЛР в компози-

ции штаммов повышались до 0,89±0,20 ед. ОП₆₃₀ и 2,2±0,30 мкг/мл×ОП₄₅₀ ($p < 0,05$). Представленные данные свидетельствуют о биосовместимости штаммов изучаемых пробиотических культур [18].

Определение антагонистической активности *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 в монокультуре и композиции. При оценке пробиотического потенциала бифидокультур важным параметром является антагонистическая активность, отражающая способность к колонизации биотопа кишечника [30]. Для определения показателя проводили сравнительный анализ антимикробного действия штаммов бифидобактерий в монокультуре и композиции против тест-штаммов условно-патогенных и патогенных культур (табл. 3). Установлено, что оба штамма бифидобактерий обладали антагонистической активностью в отношении кишечной палочки, клебсиеллы и стафилококка, а культура *B. longum* ICIS-505 дополнительно подавляла рост тест-штаммов дрожжевых грибов, протей и шигеллы. При этом композиция штаммов обладала более выраженной антагонистической активностью (зоны угнетения роста тест-культур 30–36 мм).

Таблица 3. Антагонистическая активность монокультур *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 и их композиции
Table 3. Antagonistic activity of mono- and co-cultures of *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505

Штаммы Strains	Зоны задержки роста тест-штаммов, мм Zones of test strain growth inhibition, mm					
	<i>C. albicans</i> ATCC 24433	<i>P. mirabilis</i> ATCC 29906	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	<i>K. pneumoniae</i> ICIS-278_PBV
<i>B. bifidum</i> ICIS-310	18,0±1,0	18,0±1,0	20,0±1,0	20,0±2,0	19,0±2,0	20,0±1,0
<i>B. longum</i> ICIS-505	21,0±2,0	22,0±3,0	21,0±2,0	22,0±2,0	20,0±2,0	24,0±1,0
<i>B. bifidum</i> ICIS-310 + <i>B. longum</i> ICIS-505	36,0±2,0*	30,0±2,0*	30,0±1,0*	30,0±2,0*	32,0±3,0*	34,0±3,0*

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

Примечание. * достоверные отличия значений относительно монокультур ($p < 0,05$).

Note. * significant differences from monocultures ($p < 0,05$).

Оценка уровня продукции уксусной кислоты штаммами бифидобактерий.

Возможным объяснением эффекта потенцирования антагонистической активности бифидобактерий в композиции может являться синергетическое действие штаммов на метаболическую активность друг друга. Проведена оценка уровня продукции бифидокультурами ацетата по определению содержания уксусной кислоты в бульоне Шадлера при культивировании монокультур бифидобактерий и их композиции (рис. 1). Показано, что повышение содержания уксусной кислоты в среде (в период от 0 до 72 ч) при культивировании композиции *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 происходило более интенсивно, чем в случае монокультур ($p < 0,05$), достигая уровня 33,2 мМ/л.

Выявленное усиление продукции ацетата в композиции бифидокультур имеет важное значение при создании препаратов пробиотиков. Известно, что уксусная кислота обладает антимикробным действием в отношении широкого спектра микроорганизмов, а кроме того, оказывает влияние на продукцию муцина, что, в свою очередь, может способствовать лучшему прикреплению пробиотических бактерий к клеткам эпителия кишечника и образованию биопленок [31].

ВЫВОДЫ

1. Проведен предварительный отбор штаммов *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 с учетом критериев микробной обсемененности в кишечнике человека, лизоцимрезистентности и биопленкообразования. Анализ генома штаммов показал, что они не имеют генов патогенности.
2. Определение устойчивости исследуемых культур к действию антибиотиков выявило, что оба штамма бифидобактерий обладают антибиотикорезистентностью к пенициллинам, гентамицину и эритромицину. Показана устойчивость штаммов к воздействию желудочного сока и желчи.

3. Анализ жизнеспособности *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 показал, что исследуемые штаммы не подавляют рост друг друга при совместном культивировании.
4. При совместном культивировании *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 выявлен синергетический эффект в отношении усиления показателей лизоцимрезистентности и биопленкообразования, что свидетельствует об адаптивном потенциале штаммов в организме человека.
5. Оценка лизоцимрезистентности и биопленкообразования может быть рекомендована в качестве показателей адаптации и персистенции микробиоты в условиях биотопа при отборе и тестировании пробиотических штаммов.

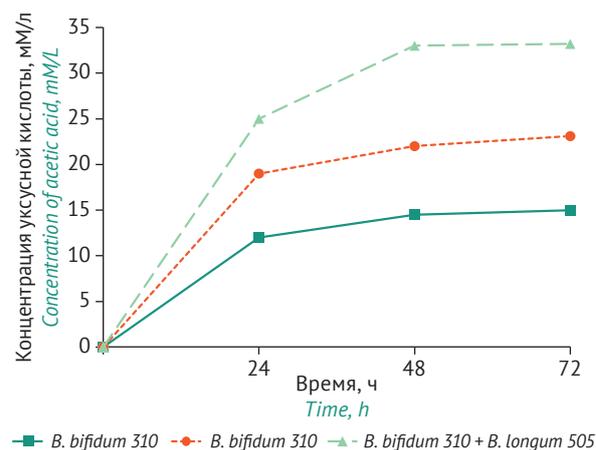


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Динамика изменения содержания уксусной кислоты в среде при культивировании монокультур *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 и их композиции. На графике представлены средние значения (M) показателя.

Fig. 1. Changes in the acetic acid concentration in mono- and co-cultures of *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 with time. The plot shows mean concentrations (M).

6. Установлено, что оба исследуемых штамма бифидобактерий проявляли антагонистическую активность в отношении тест-штаммов условно-патогенных и патогенных культур. При этом композиция обладала более выраженной антагонистической активностью, а также более высокой способностью к продукции уксусной кислоты, что свидетельствует об их синергетическом действии.
7. Штаммы *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 и их композиция перспективны с целью создания новых пробиотических препаратов.
8. Актуальным направлением дальнейших исследований является проведение сравнительного анализа эффективности разработанной композиции штаммов бифидобактерий с коммерчески доступными пробиотическими препаратами.

Литература/References

1. Бухарин ОВ, Перунова НБ, Иванова ЕВ. *Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека*. Екатеринбург: УрО РАН; 2014. Bukharin OV, Perunova NB, Ivanova EV. *Bifidoflora in human associative symbiosis*. Екатеринбург: УрО РАН; 2014 (In Russ.).
2. Шендеров БА. *Медицинская микробная экология и функциональное питание*. М.: ГРАИТЪ; 1998. Shenderov BA. *Medical microbial ecology and functional nutrition*. Moscow: GRANT; 1998 (In Russ.).
3. Бухарин ОВ, Иванова ЕВ, Перунова НБ. Коренные штаммы бифидобактерий кишечника человека: индигенность через призму персистенции. *Вестник Российской Академии Наук*. 2023;93(11):1071–80. Bukharin OV, Ivanova EV, Perunova NB. Native strains of human intestinal bifidobacteria: Indigeneity through the prism of persistence. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences*. 2023;93(11):1071–80 (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0869587323110026>
4. Alessandri G, Ossiprandi MC, MacSharry J, van Sinderen D, Ventura M. Bifidobacterial dialogue with its human host and consequent modulation of the immune system. *Front Immunol*. 2019;10:2348. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02348>
5. Aw W, Fukuda S. Protective effects of bifidobacteria against enteropathogens. *Microb Biotechnol*. 2019;12(6):1097–100. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13460>
6. Bottacini F, van Sinderen D, Ventura M. Omics of bifidobacteria: Research and insights into their health-promoting activities. *Biochem J*. 2017;474(24):4137–52. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160756>
7. Bozkurt HS, Quigley EM. The probiotic *Bifidobacterium* in the management of Coronavirus: A theoretical basis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2020;34:2058738420961304. <https://doi.org/10.1177/2058738420961304>
8. He BL, Xiong Y, Hu TG, Zong MH, Wu H. *Bifidobacterium* spp. as functional foods: A review of current status, challenges, and strategies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022;63(26):8048–65. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2054934>
9. McFarland LV, Evans CT, Goldstein EJC. Strain-specificity and disease-specificity of probiotic efficacy: A systematic review and meta-analysis. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:124. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00124>
10. Zólkiewicz J, Marzec A, Ruszczynski M, Feleszko W. Postbiotics – a step beyond pre- and probiotics. *Nutrients*. 2020;12(8):2189. <https://doi.org/10.3390/nu12082189>
11. Merenstein D, Pot B, Leyer G, Ouwehand AC, Preidis GA, Elkins CA, et al. Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives. *Gut Microbes*. 2023;15(1):2185034. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2185034>
12. Амерханова АМ, Алешкин АВ, Жиленкова ОГ. Консорциум бифидобактерий и лактобацилл, используемый для приготовления бактериальных препаратов и биологически активных добавок, предназначенных для коррекции микрофлоры людей старше 14 лет, способ его получения, биологически активная добавка к пище для коррекции микрофлоры желудочно-кишечного тракта людей старше 14 лет и бактериальный препарат для лечения дисбиотических состояний желудочно-кишечного тракта людей старше 14 лет. Патент Российской Федерации № 2491336; 2013. Amerkhanova AM, Aleshkin AV, Zhilenkova OG. Bifidobacterial and lactobacillary consortium for preparing bacterial preparations and dietary supplements for correcting gastrointestinal microflora in individuals of fourteen and older, and method for preparing it, dietary supplement for correcting gastrointestinal microflora in individuals of fourteen and older and bacterial preparation for treating dysbiotic gastrointestinal conditions in individuals of fourteen and older. Patent of the Russian Federation No. 2491336; 2013 (In Russ.). EDN: [GRJUWE](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00)
13. Глушанова НА, Вербицкая НБ, Петров ЛИ, Блинов АИ, Шендеров БА. Исследование ауто-, изо- и гомоантагонизма пробиотических штаммов лактобацилл. *Бюллетень ВШЦ СО РАМН*. 2005;(6):138–42. Glushanova NA, Verbitskaya NB, Petrov LI, Blinov AI, Shenderov BA. Study of auto-, iso- and gomoantagonism of probiotical lactobacilli strains. *Bulletin of the VSNC SO RAMN*. 2005;(6):138–42 (In Russ.). EDN: [LGKXGN](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007081)
14. Бухарин ОВ. *Персистенция патогенных бактерий*. М.: Медицина; 1999. Bukharin OV. *Persistence of pathogenic bacteria*. Moscow: Meditsina; 1999 (In Russ.).
15. Zielke RA, LeVan A, Baarda BI, Herrera MF, Acosta CJ, Jerse AE, Sikora AE. SluC is a surface-displayed lipoprotein that is required for the anti-lysozyme strategy during *Neisseria gonorrhoeae* infection. *PLoS Pathog*. 2018;5;14(7):e1007081. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007081>
16. Ножевникова АН, Бочкова ЕА, Плакунов ВК. Мультивидовые биоупленки в экологии, медицине и биотехнологии. *Микробиология*. 2017;84(6):623–44. Nozhevnikova AN, Bochkova EA, Plakunov VK. Multispecies biofilms in ecology, medicine and biotechnology. *Microbiology*. 2017;84(6):623–44 (In Russ.). <https://doi.org/10.7868/S0002635615060117>
17. Бухарин ОВ, Иванова ЕВ, Перунова НБ. Способ отбора индигенных штаммов бифидобактерий кишечника человека для их включения в состав пробиотических препаратов. Патент Российской Федерации № 2806579; 2023. Bukharin OV, Ivanova EV, Perunova NB. Method of selection of indigenic strains of human intestinal bifidobacteria for their inclusion in probiotic preparations. Patent of the Russian Federation No. 2806579; 2023 (In Russ.). EDN: [DSDIIC](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00)
18. Бухарин ОВ, Перунова НБ, Иванова ЕВ. Способ определения уровня биосовместимости штаммов бифидобактерий и/или лактобактерий. Патент Российской Федерации № 2676910; 2019. Bukharin OV, Perunova NB, Ivanova EV. Method for determining level of biocompatibility of bifid bacteria and/or lactic bacteria strains. Patent of the Russian Federation No. 2676910; 2019 (In Russ.). EDN: [SCYHTI](https://doi.org/10.3390/biology10040322)
19. Kwoji ID, Aiyegoro OA, Okpeku M, Adeleke MA. Multi-strain probiotics: Synergy among isolates enhances biological activities. *Biology (Basel)*. 2021;10(4):322. <https://doi.org/10.3390/biology10040322>
20. Бухарин ОВ, Перунова НБ, Иванова ЕВ, Бекпергенова АВ. Штамм бактерий *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 – продуцент ингибитора провоспалительного цитокина ИФН-γ. Патент Российской Федерации № 2670054; 2018. Bukharin OV, Perunova NB, Ivanova EV, Bekpergenova AV. *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 bacterium strain – producer of inhibitor of pro-inflammatory cytokine INF-γ. Patent of the Russian Federation No. 2670054; 2018 (In Russ.). EDN: [WAICBT](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00)
21. Бухарин ОВ, Иванова ЕВ, Перунова НБ, Андрущенко СВ. Штамм бактерий *Bifidobacterium longum* ICIS-505 – продуцент биологически активных веществ, обладающих антиперсистентной активностью в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий и дрожжевых грибов. Патент Российской Федерации № 2704423; 2018. Bukharin OV, Perunova NB, Ivanova EV, Andryushchenko SV. Bacterial strain *Bifidobacterium longum* ICIS-505 – producer of biologically active substances possessing antipersistent activity with respect to opportunistic and pathogenic bacteria and yeast fungi. Patent of the Russian Federation No. 2704423; 2018 (In Russ.). EDN: [IYKBDB](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00)
22. Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol*. 2005; Chapter 1:Unit-1B.1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00>

23. Mater DD, Langella P, Corthier G, Flores MJ. A probiotic *Lactobacillus* strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2008;14(1–3):123–7. <https://doi.org/10.1159/000106091>
24. Pino A, Bartolo E, Caggia C, Cianci A, Randazzo CL. Detection of vaginal lactobacilli as probiotic candidates. *Sci Rep*. 2019; 9(1):3355. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40304-3>
25. Toomey N, Bolton D, Fanning S. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Res Microbiol*. 2010;161(2):127–35. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.12.010>
26. Li B, Chen D, Lin F, Wu C, Cao L, Chen H, et al. Genomic island-mediated horizontal transfer of the erythromycin resistance gene erm(X) among *Bifidobacteria*. *Appl Environ Microbiol*. 2022;88(10):e0041022. <https://doi.org/10.1128/aem.00410-22>
27. Андриященко СВ, Иванова ЕВ, Перунова НБ, Бухарин ОВ. Генетическая характеристика адаптивного потенциала бифидобактерий биотопа дистального отдела кишечника человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2018;(4):4–11. Andryushchenko SV, Ivanova EV, Perunova NB, Bukharin OV. Genetic characteristics of the adaptive potential of bifidobacteria in the biotope of distal human intestine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;(4):4–11 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-4-11>
28. Mallick S, Das S. Acid-tolerant bacteria and prospects in industrial and environmental applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2023;107(11):3355–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12529-w>
29. Несчислаев ВА, Мокин ПА, Орлова ЕВ, Маслов ЮН, Савина АС. Кислотообразование и кислотоустойчивость пробиотиков. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2020;22(6):34–8. Neschislyayev VA, Mokin PA, Orlova EV, Maslov YuN, Savina AS. Acid formation and acid resistance of probiotics. *Medical & Pharmaceutical Journal "Pulse"*. 2020;22(6):34–8 (In Russ.). EDN: XMXIX
30. Meghrou J, Euloge P, Junelles AM, Ballongue J, Petitdemanche H. Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocins production. *Biotechnol Lett*. 1990;12:575–80. <https://doi.org/10.1007/BF01030755>
31. Bilotta AJ, Cong Y. Gut microbiota metabolite regulation of host defenses at mucosal surfaces: Implication in precision medicine. *Precis Clin Med*. 2019;2(2):110–9. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbz008>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещена *таблица S1*. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-565-table-s1>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Н.Б. Перунова** – дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, критическое обсуждение текста рукописи; **О.В. Бухарин** – разработка концепции исследования; **Е.В. Иванова** – дизайн исследования, анализ полногеномного секвенирования исследуемых штаммов, сбор и анализ результатов исследования; **А.В. Бекперженова** – идентификация выделенных микроорганизмов генетическим методом, биоинформатическая обработка данных, определение антибиотико-резистентности и устойчивости к желудочному соку и желчи, написание текста рукописи; **Т.А. Бондаренко** – исследование антагонистической активности, жизнеспособности, биопленкообразования и антилизоцимной активности бифидобактерий.

Благодарности. Авторы выражают признательность сотрудникам Центра коллективного пользования «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН (заведующий, канд. мед. наук, доц. А.О. Плотников) за представленные результаты полногеномного секвенирования штаммов бифидобактерий. Авторы благодарны канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаборатории инфекционной симбиологии ИКВС УрО РАН С.В. Андриященко за работу по размещению секвенированных геномов бифидобактерий в базах данных NCBI GenBank.

Additional information. *Table S1* is published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **N.B. Perunova** designed the study, analysed and interpreted the study results, and critically discussed the manuscript. **O.V. Bukharin** conceptualised the study. **E.V. Ivanova** designed the study, analysed the full-genome sequencing of the strains under study, collected and analysed the study results. **A.V. Bekpergenova** identified isolated microorganisms using the genetic method; performed bioinformatics processing of data; measured resistance to antimicrobials, gastric acid, and bile; and drafted the manuscript. **T.A. Bondarenko** studied the antagonistic activity, viability, biofilm formation, and antilysozyme activity of bifidobacteria.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to the team of the Center for Collective Use "Persistence of Microorganisms" of the Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (and A.O. Plotnikov, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Center for Collective Use) for providing the results of whole-genome sequencing of bifidobacteria strains. The authors also thank S.V. Andryushchenko, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Scientist at the Laboratory of Infectious Symbiology of the Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, for his work in depositing sequenced bifidobacterial genomes into the NCBI GenBank database.

Об авторах / Authors

Перунова Наталья Борисовна, д-р мед. наук, доц., проф. РАН / **Natalia B. Perunova**, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Prof. RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6352-8879>

Бухарин Олег Валерьевич, д-р мед. наук, проф., акад. РАН / **Oleg V. Bukharin**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6039-5265>

Иванова Елена Валерьевна, д-р мед. наук, доц. / **Elena V. Ivanova**, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4974-8947>

Бекперженова Анастасия Владимировна, канд. биол. наук / **Anastasia V. Bekpergenova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5020-2493>

Бондаренко Таисия Александровна, канд. биол. наук / **Taisia A. Bondarenko**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5186-6865>

Поступила 25.03.2024

После доработки 22.01.2025

Принята к публикации 22.01.2025

Online first 13.05.2025

Received 25 March 2024

Revised 22 January 2025

Accepted 22 January 2025

Online first 13 May 2025



Разработка количественной иммуноферментной тест-системы для определения концентрации E2 антигена вируса Чикунгунья и расчета массы цельновирионного антигена в культуральных образцах

Б. Тахан^{1,3}, Л.Н. Притворова², Т.Г. Самарцева², С.А. Кедик¹, А.С. Оксанич² ✉

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет», просп. Вернадского, д. 78, Москва, 119454, Российская Федерация

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

³ Университет Алеппо, факультет естественных наук, г. Алеппо, 12212, Сирийская Арабская Республика

✉ Оксанич Алексей Сергеевич; oksanich@yahoo.com

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Вирус Чикунгунья (ВЧИК) за последние годы широко распространился во многих частях мира, вызывая крупномасштабные вспышки с серьезными экономическими и социальными последствиями. Для повышения эффективности борьбы с вирусом необходимо разрабатывать и совершенствовать методы диагностики ВЧИК не только в сыворотке крови пациентов, но и в полевых материалах – для выявления и уничтожения очагов инфекции. Определение антигенов ВЧИК также важно проводить в образцах культуральной жидкости на разных этапах разработки и производства вакцин.

ЦЕЛЬ. Разработка количественной тест-системы на основе одностадийного сэндвич-варианта иммуноферментного анализа для выявления E2 антигена вируса Чикунгунья в культуральных жидкостях, а также методики расчета массы цельновирионного антигена в образце.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе использовали два мышиных моноклональных антитела к ВЧИК; очищенный вирус Чикунгунья (штамм Nika21, GenBank ID PQ673601) и рекомбинантный E2 антиген ВЧИК. Для сравнения чувствительности методов иммуноферментного анализа (ИФА) и обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в режиме реального времени (ОТ-кПЦР-РВ) использовали образцы культуральной жидкости, которые собирали в разные временные точки (18, 24, 46, 72 ч) после заражения ВЧИК клеток Vero. Основные аналитические и технические характеристики разработанной ИФА тест-системы определяли в соответствии с требованиями ГОСТ 51352–2013.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Аналитическая чувствительность метода составила не менее 0,625 нг/мл, значение коэффициента вариации – не более 3,56%, тест на «открытие» – 100%, результаты теста на «линейность» в диапазоне концентраций 1,5–16 нг/мл были в пределах 90–110%. Специфичность метода составила 100%; перекрестная реактивность не наблюдалась с образцами, содержащими вирусы денге, желтой лихорадки, Синдбис, краснухи и вирус Западного Нила. Разработанная ИФА тест-система и метод ОТ-кПЦР-РВ продемонстрировали схожие результаты при определении массы цельновирионного антигена в вирусосодержащей жидкости – 1,06 и 1,09 мкг/мл соответственно при использовании коэффициента пересчета.

ВЫВОДЫ. Для количественного определения E2 антигена ВЧИК в культуральных образцах была разработана простая, специфичная и чувствительная ИФА тест-система, которую также можно использовать для быстрого анализа полевых образцов. Предложен метод расчета массы цельновирионного антигена по количеству E2 белка (ИФА) и геномным эквивалентам (ОТ-кПЦР-РВ). Между оптической плотностью в ИФА и пороговым циклом в ПЦР-РВ установлена сильная обратная корреляция.

Ключевые слова: вирус Чикунгунья; E2 антиген вируса Чикунгунья; иммуноферментный анализ; сэндвич-метод ИФА; мышинные моноклональные антитела; вирусосодержащая жидкость; количественная ПЦР с обратной транскрипцией; ПЦР в реальном времени

Для цитирования: Тахан Б., Притворова Л.Н., Самарцева Т.Г., Кедик С.А., Оксанич А.С. Разработка количественной иммуноферментной тест-системы для определения концентрации E2 антигена вируса Чикунгунья и расчета массы цельновирионного антигена в культуральных образцах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2025;25(2):214–225. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632>

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 22-14-00184.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Development of an enzyme-linked immunosorbent assay test system for quantifying Chikungunya virus E2 protein and calculating the mass of whole-virion antigen in culture fluid samples

Bana Tahhan^{1,3}, Lyudmila N. Pritvorova², Tatiana G. Samartseva², Stanislav A. Kedik¹, Alexey S. Oksanich²✉

¹ MIREA – Russian Technological University, 78 Vernadsky Ave, Moscow 119454, Russian Federation

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

³ University of Aleppo, Faculty of Science, Department of Chemistry, 12212 Aleppo, Syrian Arab Republic

✉ Alexey S. Oksanich; oksanich@yahoo.com

ABSTRACT

INTRODUCTION. In recent years, Chikungunya virus (CHIKV) has spread in many parts of the world and has caused large-scale outbreaks with serious economic and social consequences. To improve the effectiveness of CHIKV control measures, it is necessary to develop and optimise diagnostic methods applicable not only to patient serum samples but also to mosquito samples (to identify and eliminate the foci of infection). In addition, it is important to determine antigens in culture fluid samples taken at various stages in the development and production of CHIKV vaccines.

AIM. This study aimed to develop a quantitative one-step sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test system for detecting CHIKV E2 protein and a procedure for calculating the mass of whole-virion antigen in culture fluid samples.

MATERIALS AND METHODS. The study focused on two mouse monoclonal antibodies, purified CHIKV (Nika21 strain, GenBank ID: PQ673601), and recombinant CHIKV E2 protein. The sensitivity of ELISA was compared with that of real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-qPCR). The comparison used culture fluid samples collected at different time points after infection of Vero cells with CHIKV (18, 24, 46, and 72 h).

The main analytical and technical characteristics of the ELISA test system developed were determined in accordance with GOST 51352-2013.

RESULTS. The sensitivity of the assay was not less than 0.625 ng/mL, and its coefficient of variation was not more than 3.56%. The recovery of the assay was 100%. The assay demonstrated an acceptable linearity of 90–110% in the concentration range of 1.5–16 ng/mL. The specificity of the assay was 100%, as no cross-reactivity was observed with samples containing dengue, yellow fever, Sindbis, rubella, and West Nile viruses. The ELISA test system developed in this study and real-time RT-qPCR showed similar results (1.06 and 1.09 µg/mL, respectively) in calculating the mass of whole-virion antigen in culture fluid samples with the use of a conversion factor.

CONCLUSIONS. A simple, specific, and sensitive ELISA test system was developed for the quantitative determination of CHIKV E2 protein in culture fluid samples (and for rapid testing of mosquito samples). The authors offered a method for calculating the mass of whole-virion antigen from the amount of E2 protein (ELISA) and the quantity of genomic equivalents (real-time RT-qPCR). The study demonstrated a strong negative correlation between optical density values obtained using ELISA and cycle threshold values derived from real-time RT-qPCR.

Keywords:

Chikungunya virus; E2 protein of Chikungunya virus; enzyme-linked immunosorbent assay; sandwich ELISA; mouse monoclonal antibodies; virus-containing fluid; reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; real-time polymerase chain reaction

For citation:

Tahhan B., Pritvorova L.N., Samartseva T.G., Kedik S.A., Oksanich A.S. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay test system for quantifying Chikungunya virus E2 protein and calculating the mass of whole-virion antigen in culture fluid samples. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(2):214–225. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632>

Funding. The study reported in this publication was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation under grant No. 22-14-00184.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус Чикунгунья (ВЧИК) является представителем рода *Alphavirus* семейства *Togaviridae*. Вирус чаще всего передается людям через укусы комаров видов *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus* при попадании вируса в слои эпидермиса и дермы кожи. Далее вирус реплицируется и распространяется в различные жизненно важные органы. Заражение ВЧИК обычно приводит к лихорадке, сыпи, миалгии и артралгии, которые могут длиться от нескольких недель до нескольких месяцев [1–3].

Геном ВЧИК представляет собой положительную одноцепочечную РНК (+ssRNA) размером около 12 тыс. нуклеотидов, содержащую 5'-метилгуанилатный кэп, полиаденилированный 3'-конец и две открытые рамки считывания. Геном ВЧИК кодирует четыре неструктурных белка (nsP1–4) и пять структурных белков (С, E3, E2, 6K и E1) [4, 5]. ВЧИК – это сферическая частица диаметром 70 нм. Вирион состоит из белкового капсида и липопротеиновой оболочки хозяина.

У ВЧИК выделяют четыре генотипа: Азиатский (Asian), Западно-Африканский (West African, WAF), Восточно-Центральный Южно-Африканский (East/Central/South African, ECSA)

и Восточно-Центральный Южно-Африканский – линия Индийского океана (East/Central/South African genotype, Indian Ocean Lineage, ECSA-IOL). Однако указанные генотипы не имеют четкой территориальной локализации, то есть на одной территории могут одновременно выявляться разные генотипы ВЧИК. После 2004 г. во время вспышек заболеваний, вызванных ВЧИК, на островах Индийского океана была выявлена эволюция линии генотипа ECSA, в которой аланин в положении 226 E1 гликопротеина был заменен на валин (E1-A226V). Эта замена, наряду со специфическими мутациями в E2 белке, позволила переносить ВЧИК комарам вида *Ae. albopictus*. Комары вида *Ae. albopictus*, в отличие от *Ae. aegypti*, обладают более высокой способностью выживать в прохладных регионах. Таким образом, адаптация ВЧИК к *Ae. albopictus* как переносчику, вероятно, содействовала резкому распространению ВЧИК и может привести к дальнейшему расширению ареала вируса как в тропических, так и в нетропических регионах [5–7].

В последние годы инфекция ВЧИК была зарегистрирована в различных частях мира, включая регион Индийского океана, Европу, Ближний Восток и Тихоокеанский регион, тогда

как ранее ВЧИК выявляли спорадически только в странах Африки и Азии. Широкое распространение ВЧИК представляет проблему для общественного здравоохранения и подчеркивает острую необходимость принятия мер предосторожности и изучения вариантов борьбы с инфекцией [8–10].

Профилактика и контроль распространения ВЧИК сопряжены с совершенствованием существующих диагностических подходов для правильного обнаружения различий между заболеваниями, вызванными ВЧИК, и другими лихорадками [11]. Возбудителями последних являются другие альфа-вирусы и, что наиболее важно, иные семейства арбовирусов, например вирусы денге и Зика, способные циркулировать в тех же географических регионах и вызывать схожие клинические симптомы, что и ВЧИК [12–14].

Обнаружение антигена может быть положено в основу одного из подходов для быстрого обнаружения ВЧИК в полевых образцах (экстракты комаров), поскольку присутствие антигена напрямую связано с присутствием вируса. В то же время при анализе полевых материалов можно также использовать реакцию обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в режиме реального времени (ОТ-кПЦР-РВ). Этот метод обладает более высокой чувствительностью, но ограниченно применим в условиях экспедиций в предполагаемые вирусные очаги.

Е2 белок ВЧИК является потенциальным целевым антигеном для серодиагностики, который может стимулировать иммунный ответ у инфицированного и выработку высокого уровня специфических антител [3, 4, 11]. Таким образом, контроль вирусосодержащих жидкостей (ВСЖ) имеет важное значение, поскольку они содержат Е2 антиген в виде рекомбинантного белка или цельновирioнного антигена и используются при изготовлении вакцинных препаратов [15–18].

В настоящее время не существует специфической терапии против ВЧИК, но в 2024 г. была зарегистрирована первая живая аттенуированная вакцина Ixchiq® (Valneva Austria GmbH, Австрия)¹. Несмотря на появление вакцины, профилактика ВЧИК по-прежнему во многом зависит от использования мер индивидуальной защиты и борьбы с переносчиками, эффективность которых ограничена [19–22].

Цель работы – разработка количественной тест-системы на основе одностадийного сэндвич-варианта иммуноферментного анализа

для выявления Е2 антигена вируса Чикунгунья в культуральных жидкостях, а также методики расчета массы цельновирioнного антигена в образце.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Вирусы. Для проведения исследования использовали вирусы Чикунгунья (штамм Nika21, генотип ECSA, GenBank ID PQ673601) и денге 2 типа [23], полученные из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. При постановке ИФА и ОТ-кПЦР-РВ использовали образцы ВСЖ, содержащие ВЧИК (штамм Nika21), отобранные через 18, 24, 46 и 72 ч после заражения клеток Vero вирусом Чикунгунья, и образцы культуральной жидкости, содержащие вирус денге и отобранные через 46 ч после заражения клеток Vero вирусом денге 2 типа (множественность заражения 0,001 MOI²), в качестве отрицательного контроля.

Антигены. При проведении ИФА использовали инактивированные β-пропиолактоном экстракты мозговых антигенов новорожденных мышей, зараженных вирусами денге (1 тип – штамм Hawaii, 2 тип – New Guinea C (NGC), 3 тип – H-87, 4 тип – H241), желтой лихорадки (штамм 17D), Западного Нила (штамм Ast-986) и Синдбис (штамм 574). Инактивированные мозговые антигены были любезно предоставлены Биотехнологической компанией «Биосервис» (Россия). Также в исследовании использовали культуральные жидкости, содержащие ВЧИК (штамм Nika21) и вирус краснухи (штамм RA-27). Вирусы были получены из коллекции вирусов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Клеточная линия Vero была получена из коллекции клеточных культур ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Рекомбинантный антиген. Для построения калибровочной прямой зависимости оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП450) от концентрации Е2 антигена ВЧИК использовали коммерческий аффинно-очищенный рекомбинантный Е2 антиген ВЧИК (штамм SL-CK1, GenBank ID ADG95913.1), полученный в бакуловирусной системе экспрессии белка (Sino Biological, Китай). Белок включает в себя 352 аминокислоты и His-метку на С-конце (молекулярная масса белка 39,8 кДа). Пробы, содержащие Е2 антиген ВЧИК в концентрациях 0,5, 1, 2, 4, 8 и 16 нг/мл, использовали при построении калибровочной прямой для его количественной оценки в исследуемых образцах ВСЖ.

¹ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ixchiq>

² Multiplicity of infection – количество инфекционных доз вируса в расчете на одну клетку.

Моноклональные антитела. В работе использовали специфические к ВЧИК мышинные моноклональные антитела (МАт), полученные по классической гибридомной технологии и свободно предоставленные Биотехнологической компанией «Биосервис» (Россия). Всего были получены два препарата МАт, узнающие различные эпитопы E2 белка ВЧИК. Одно МАт (клон МАт25) использовали для сорбции на 96-луночных планшетах, а второе (клон МАт26) было конъюгировано с пероксидазой хрена.

Методы

Подготовка иммуносорбента. На поверхности лунок 96-луночных ИФА-планшетов (кат. № 2592, Corning, США) с высоким уровнем сорбции (до 500 нг IgG/см²) адсорбировали МАт25 в концентрации 2 мкг/мл, разведенные в карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6), из расчета 100 мкл/лунка. Планшеты инкубировали в течение 16–18 ч при температуре 4 °С. После сорбции планшеты пятикратно промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,5) с добавлением 0,05% Твин-20 (ФСБ-Т), а затем поверхность лунок блокировали в течение 2 ч при комнатной температуре 1% раствором казеина в ФСБ из расчета 200 мкл/лунка.

Положительный контрольный образец инактивированный (K⁺). В качестве положительного контрольного образца при постановке ИФА использовали рекомбинантный коммерческий E2 антиген ВЧИК (Sino Biological, Китай), описание которого приведено выше.

Отрицательный контрольный образец инактивированный (K⁻). В качестве отрицательного контроля при постановке ИФА использовали лизат интактной культуры клеток Vero.

Приготовление культуральной жидкости, содержащей вирус Чикунгунья. В экспериментах для получения ВСЖ использовали ВЧИК (штамм Nika21). Нуклеотидная последовательность штамма Nika21 депонирована в GenBank ID PQ673601³. Доза заражения ВЧИК составляла 0,0001 MOI, что соответствовало 100 ТЦД₅₀/100 мкл (ТЦД₅₀ – показатель тканевой цитопатической дозы, вызывающей гибель 50% клеток). Вирус наносили на монослой клеток линии Vero, выращенных в культуральных флаконах Corning® (США) площадью 25 см². Вирус адсорбировали в течение 1 ч, после чего во флаконы добавляли среду поддержки DMEM (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»), содержащую 2% фетальной эмбриональной сыворотки (Gibco, США). Флаконы находились в термостате в течение 3 сут при температуре 32 °С

и с 5% содержанием CO₂, после чего полученную ВСЖ исследовали в ИФА или ОТ-кПЦР-РВ.

Пробоподготовка ВСЖ для ИФА и ОТ-кПЦР-РВ. В четыре пробирки добавляли по 500 мкл ВСЖ, в две из них вносили 25 мкл РНКазы («Биолот», Россия) до конечной концентрации 50 мкг/мл, а в остальные пробирки – 25 мкл ФСБ и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Образцы ВСЖ, обработанные и необработанные РНКазой, анализировали в ИФА в четырех повторах согласно разработанному нами протоколу. ОТ-кПЦР-РВ проводили в трех повторах, как это было описано ранее. По калибровочным прямым оценивали геном-эквиваленты на 1 мл по данным ОТ-кПЦР-РВ, и концентрацию E2 белка по данным ИФА, а затем рассчитывали общую концентрацию вирусного антигена.

Протокол одностадийного сэндвич-варианта метода ИФА. При постановке ИФА все образцы вносили в лунки в двух повторах. Для анализа брали по 50 мкл исследуемых образцов культуральной жидкости, содержащей вирус Чикунгунья, и контрольных образцов в рабочем разведении, а также калибровочные пробы в концентрациях 0,5, 1, 2, 4, 8 и 16 нг/мл. Затем вносили по 50 мкл раствора конъюгата МАт26 с пероксидазой хрена в рабочем разведении. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, после чего лунки пятикратно промывали ФСБ-Т. Затем в лунки вносили по 100 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с пероксидом водорода и инкубировали при комнатной температуре (23–25 °С). Реакцию ИФА останавливали через 15 мин добавлением в лунки 50 мкл раствора 0,5 М серной кислоты и сразу определяли ОП450 с помощью микропланшетного спектрофотометра LisaScan EM (Erba Mannheim, Чехия) при длине волны сравнения 620 нм.

Выделение РНК из образцов ВСЖ проводили при помощи комплекта реагентов «АмплиСенс®Магно-Сорб» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя.

ОТ-кПЦР-РВ. Для количественной оценки геном-эквивалентов (ГЭ) ВЧИК в ВСЖ использовали реакцию обратной транскрипции (ОТ) с последующей количественной ПЦР в режиме реального времени (ОТ-кПЦР-РВ) [23]. Для проведения реакций ОТ и ПЦР применяли реагенты НПК «Синтол» (Россия).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2016. Данные представлены в виде среднего значения (*M*) и стандартного отклонения среднего (*SD*),

³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/PQ673601>

где это было приемлемо. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью непарного двухстороннего t -критерия Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. При построении калибровочных графиков рассчитывали коэффициент детерминации (R^2) с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2016. Коэффициент корреляции Пирсона (r_{xy}) применяли для оценки связи между параметрами количественных методов.

Дизайн исследования

При оценке диагностических характеристик разработанной ИФА тест-системы для количественного определения E2 антигена ВЧИК руководствовались требованиями ГОСТ 51352–2013⁴. Оценивали аналитическую чувствительность, специфичность, воспроизводимость и коэффициент вариации, проводили тесты на «линейность» и на «открытие» (метод добавок). После определения эффективности ИФА тест-системы проводили ее сравнение с ранее разработанным методом ОТ-кПЦР-РВ, для чего анализируемую ВСЖ разделяли на 4 пробирки. Образцы в первых двух пробирках обрабатывали РНКазой, а в остальных – обработку не проводили. Далее образцы анализировали методом ИФА и ОТ-кПЦР-РВ. Обработку РНКазой проводили для оценки только той РНК, которая находилась внутри вирионов; образцы без обработки РНКазой использовали в качестве сравнения. Исходя из данных о молекулярных массах вириона и E2 белка ВЧИК пересчитывали установленные при помощи двух количественных методов геном-эквиваленты и массы E2 белка в массу цельновирионного антигена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количественное определение E2 белка вируса Чикунгунья методом одностадийного сэндвич-варианта иммуноферментного анализа

Основной целью нашего исследования была разработка иммуноферментной тест-системы для количественного определения E2 белка ВЧИК в культуральной жидкости с использованием двух МАт к различным эпитомам E2 белка ВЧИК, одно из которых сорбировали на твердую фазу, а второе было конъюгировано с пероксидазой хрена. Принцип разработанной тест-системы основан на одновременном взаимодействии МАт25, адсорбированных на поверхности лунок ИФА-планшетов, и конъюгата

МАт26 с пероксидазой хрена, с E2 антигеном ВЧИК, присутствующим в образцах культуральной жидкости и калибровочных пробах. При добавлении раствора, содержащего хромоген ТМБ и пероксид водорода, образуется окрашенный комплекс, что подтверждает связывание конъюгата с комплексом МАт25–E2 антигена ВЧИК. Интенсивность окраски раствора, возникающей при остановке реакции, прямо пропорциональна концентрации E2 белка ВЧИК в исследуемых образцах.

Существующие методы диагностики ВЧИК до сих пор имеют недостатки, несмотря на большое количество исследований в этой области. Совершенствование диагностики особенно актуально для раннего выявления вируса в острой фазе заболевания и в природных очагах [24, 25]. Чувствительность и специфичность ИФА с захватом антигена зависят от качества самого антигена и мышиных моноклональных антител, используемых в экспериментах [26, 27]. Поскольку недавние исследования показали, что большинство гуморальных реакций человека при инфекции ВЧИК направлено против E2 белка, то это свидетельствует о том, что основные нейтрализующие антитела имеют специфичность именно к этому белку [28]. Поверхностный E2 антиген обычно входит в состав разрабатываемых вакцинных препаратов против ВЧИК. Для контроля их качества, а также расчета дозы в лекарственной форме необходима ИФА тест-система для количественного определения E2 белка ВЧИК.

Обширная перекрестная реактивность среди близкородственных представителей рода *Alphavirus* требует использования высокоселективных и специфических антител для дифференцирования вируса Чикунгунья от других альфавирусов с высокой степенью точности [29]. Таким образом, использование МАт является наиболее надежным вариантом для разработки оптимальных недорогих диагностических методов [30, 31]. Иммуноферментные тест-системы, основанные на использовании МАт, имеют более высокую специфичность при дифференциальной диагностике вируса Чикунгунья, чем ИФА тест-системы, в которых применяют поликлональные антитела [32].

Определение количественного содержания антигенного E2 белка ВЧИК в образцах культуральной жидкости

Для количественного определения E2 белка ВЧИК в исследуемых образцах при каждой

⁴ ГОСТ 51352–2013. Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.

постановке ИФА использовали калибровочную прямую. Оптимальный диапазон концентраций калибруемых образцов (0,5–16 нг/мл E2 белка) определяли путем титрования серии различных концентраций при условии $R^2 \geq 0,99$ (рис. 1).

Количественное содержание E2 белка ВЧИК в исследуемых образцах культуральной жидкости определяли по уравнению линейной регрессии, выведенному по результатам титрования калибратора. Для расчета концентрации антигена в каждом из исследуемых образцов культуральной жидкости подставляли значения оптической плотности для каждого образца в уравнение линейной регрессии по формуле (1):

$$y = ax + b, \quad (1)$$

где y – концентрация E2 белка вируса Чикунгунья в исследуемых образцах (нг/мл); x – оптическая плотность исследуемых образцов при длине волны 450 нм; a и b – постоянные коэффициенты.

Полученное через уравнение линейной регрессии значение концентрации умножали на коэффициент разведения исследуемого образца, равный 10.

Оценка основных функциональных характеристик разработанной тест-системы

Оценку аналитической чувствительности, специфичности, воспроизводимости и других характеристик разработанной тест-системы проводили в соответствии с рекомендациями ГОСТ Р 51352-2013.

Аналитическую чувствительность оценивали следующим образом. В лунки ИФА-планшета трех разных серий вносили нулевую калибровочную пробу в 8 повторах и калибровочные пробы, содержащие 0,5–16 нг/мл E2 белка (рис. 1), и затем проводили ИФА согласно разработанному протоколу. По результатам калибровки строили калибровочный график и рассчитывали среднее значение ОП нулевой калибровочной пробы и стандартное отклонение. Подставляли полученные значения в формулу (2):

$$V_0 + 2\sigma, \quad (2)$$

где V_0 – среднее значение оптической плотности нулевой калибровочной пробы; σ – стандартное отклонение оптической плотности нулевой калибровочной пробы.

Из полученного значения ОП проводили прямую, перпендикулярную оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком; затем из точки пересечения проводили параллель

на ось ординат. Соответствующая этому значению концентрация характеризовала аналитическую чувствительность метода. Эксперимент по аналитической чувствительности повторяли трижды и затем рассчитывали среднее значение (табл. S1, опубликована на сайте журнала⁵).

Таким образом, среднее значение аналитической чувствительности разработанной ИФА тест-системы составило 0,625 нг/мл.

Тест на «линейность» проводили на 3 сериях планшетов, для чего сформировали две группы разведений калибровочной пробы, содержащей E2 белок ВЧИК. В первую группу были включены калибраторы с концентрациями 1,25, 2,5, 5 и 10 нг/мл, во вторую – 0,75, 1,5, 3 и 6 нг/мл E2 белка. Затем сравнивали концентрации, полученные в ИФА (фактическое практическое значение) с рассчитанными концентрациями E2 белка в этих разведенных пробах (теоретическое значение), и рассчитывали значение параметра «линейность» (Л) по формуле (3):

$$Л = \frac{C_{\text{пр}}}{C_{\text{т}}} \times 100, \quad (3)$$

где $C_{\text{пр}}$ – полученное по калибровочному графику фактическое практическое значение концентрации анализируемого E2 белка ВЧИК в исследуемой пробе; $C_{\text{т}}$ – расчетное теоретическое значение концентрации E2 белка ВЧИК в исследуемой пробе.

Результаты теста на «линейность» представлены в таблице S2 (опубликована на сайте журнала⁶).

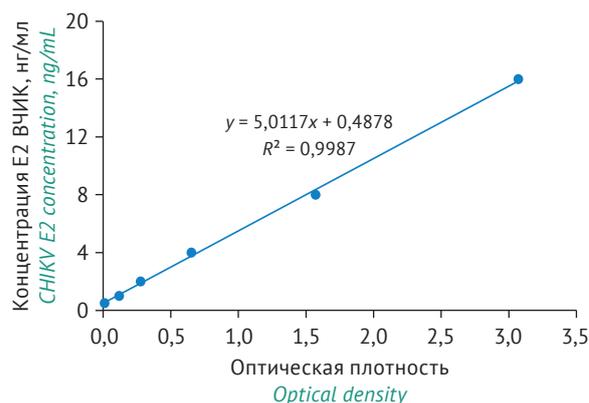


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. График зависимости оптической плотности при длине волны 450 нм от концентрации E2 белка вируса Чикунгунья (ВЧИК) в калибровочных образцах в диапазоне концентрации от 0,5 до 16 нг/мл.

Fig. 1. Optical density at 450 nm as a function of Chikungunya virus (CHIKV) E2 protein concentration in calibration samples (concentration range: 0.5–16 ng/mL).

⁵ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632-table-s1>

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632-table-s2>

Экспериментально установлено, что тест на «линейность» разработанной ИФА тест-системы в диапазоне концентрации 1,5–16 нг/мл допустим в пределах 90–110%.

Коэффициент вариации. Для оценки коэффициента вариации (КВ) выбирали 3 различные концентрации E2 белка ВЧИК в калибровочных пробах: 16 нг/мл (высокая), 8 нг/мл (средняя) и 2 нг/мл (низкая). ИФА проводили на трех сериях планшетов, анализируя пробы с исследуемыми значениями концентрации в 8 повторях. Затем рассчитывали КВ, разделив значение стандартного отклонения на среднее значение для каждой из трех концентраций по формуле (4):

$$KB = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100, \quad (4)$$

где σ – стандартное отклонение оптической плотности анализируемой пробы, содержащей E2 белок ВЧИК; \bar{X} – среднее значение оптической плотности анализируемой пробы, содержащей E2 белок ВЧИК; КВ – коэффициент вариации.

Результаты оценки КВ представлены в *таблице S3* (опубликована на сайте журнала⁷).

Среднее значение КВ разработанной тест-системы составило 3,56%, что считается удовлетворительным, поскольку данное значение ниже 8%.

Тест на «открытие». Для проведения ИФА использовали один и тот же объем двух разных концентраций калибровочной пробы и, смешав их вместе, анализировали каждую смешанную пробу в 8 повторях. Эксперимент проводили на трех сериях планшетов, после чего рассчитывали значение параметра теста на «открытие» (ОТ) путем сравнения значения концентрации E2 белка в калибровочных пробах (фактическое практическое значение) с рассчитанным теоретическим значением по формуле (5):

$$OT = \frac{C_{\text{пр}}}{C_{\text{т}}} \times 100, \quad (5)$$

где $C_{\text{пр}}$ – полученное по калибровочному графику фактическое практическое значение концентрации анализируемого E2 белка ВЧИК в исследуемой пробе; $C_{\text{т}}$ – расчетное теоретическое значение концентрации E2 белка ВЧИК в исследуемой пробе. Результаты эксперимента приведены в *таблице S4* (опубликована на сайте журнала⁸).

Тест на «открытие» разработанной ИФА тест-системы составил 100%.

Специфичность. Для оценки специфичности разработанной ИФА тест-системы изучали перекрестную реактивность с другими арбовирусами, передаваемыми комарами. В экспериментах использовали вирусы денге (1 тип – штамм Hawaii, 2 тип – New Guinea C, 3 тип – H-87, 4 тип – H241), желтой лихорадки (штамм 17D), Синдбис (штамм 574), краснухи (RA-27) и лихорадки Западного Нила (штамм Ast-986). В результате выполненного ИФА не наблюдали положительных реакций с перечисленными вирусами. Таким образом, специфичность разработанной тест-системы составила 100%.

По результатам проведенных тестов были определены значения следующих параметров тест-системы: аналитическая чувствительность – 0,625 нг/мл; тест на «линейность» – 90–110% в диапазоне концентраций 1,5–16 нг/мл E2 белка ВЧИК; тест на «открытие» – 100%; среднее значение коэффициента вариации – 3,56%; специфичность – 100%. Оценка основных характеристик разработанной количественной ИФА тест-системы показывает, что она обладает высокой точностью, специфичностью и аналитической чувствительностью при выявлении E2 белка вируса Чикунгунья.

Сравнение чувствительности методов ОТ-кПЦР-РВ и ИФА при выявлении ВЧИК в культуральной жидкости

После заражения ВЧИК клеток Vero отбирали пробы культуральной жидкости, содержащей ВЧИК (ВСЖ), в разные временные точки от начала заражения клеток (18, 24, 46 и 72 ч). В качестве контроля заражали клетки Vero вирусом денге 2. Затем проводили ИФА по протоколу, описанному в разделе «Материалы и методы», и ОТ-кПЦР-РВ по методике, описанной в работе А.С. Оксанич с соавт. [33].

С помощью ОТ-кПЦР-РВ (*табл. 1*) удалось обнаружить вирус Чикунгунья в образцах культуральной жидкости на всех стадиях заражения клеток, при этом количество вирусной РНК нарастало к 72 ч. По данным ИФА ВЧИК был выявлен в образцах начиная с 46 ч после заражения ВЧИК клеток Vero. Таким образом, для контроля наличия антигена при работе вируса количественный ИФА можно использовать не ранее чем через двое суток после заражения.

⁷ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632-table-s3>

⁸ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632-table-s4>

Таблица 1. Результаты анализа образцов культуральной жидкости в разные временные точки от начала заражения клеток Vero вирусом Чикунгунья**Table 1.** Results of analysis of culture fluid samples taken at different time points after infection of Vero cells with CHIKV

Вид образца <i>Sample type</i>	ИФА <i>ELISA</i>	ОТ-ПЦР в реальном времени <i>Real-time RT-PCR</i>
	ОП ₄₅₀ / OD ₄₅₀	ПЦ / Ct
Контроль среды выделения / <i>Isolation medium control</i>	н/о / n/d	≥40,0
Контроль среды клеток / <i>Culture fluid control</i>	0,004	н/о / n/d
Контроль клеток (46 ч) / <i>Cell control (46 h)</i>	0,003	≥40,0
ВСЖ ВЧИК (18 ч) / <i>CHIKV VCF (18 h)</i>	0,024	24,4
ВСЖ ВЧИК 24 ч / <i>CHIKV VCF (24 h)</i>	0,017	25,9
ВСЖ ВЧИК 46 ч / <i>CHIKV VCF (46 h)</i>	2,419	18,2
ВСЖ ВЧИК 72 ч / <i>CHIKV VCF (72 h)</i>	3,124	16,2
Положительный контроль / <i>Positive control</i>	1,660	13,1
Отрицательный контроль / <i>Negative control</i>	0,011	≥40,0
ВСЖ денге (46 ч) / <i>Dengue VCF (46 h)</i>	0,008	≥40,0
Исходный образец / <i>Original sample</i>	н/о / n/d	30,6

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

Примечание. ИФА – иммуноферментный анализ; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ОП₄₅₀ – оптическая плотность при 450 нм; ПЦ – пороговый цикл; ВСЖ – вирусодержащая жидкость; ВЧИК – вирус Чикунгунья; н/о – не определяли.

Note. ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; OD₄₅₀, optical density at 450 nm; Ct, cycle threshold; VCF, virus-containing fluid; CHIKV, Chikungunya virus; n/d, not determined.

Расчет массы цельновирионного антигена вируса Чикунгунья через концентрацию E2 антигена

На поверхности вируса Чикунгунья располагаются 80 шипов, представляющих собой тримеры, состоящие из гетеродимеров поверхностных гликопротеинов E1 и E2. Количество молекул E2 гликопротеина в одном вирионе составляет 240 [36, 37]. Известно, что молекулярная масса (ММ) целого вириона альфа-вирусов составляет 52 мДа, а ММ одного E2 гликопротеина – 50 кДа [38], то есть масса всего E2 белка в вирусной частице составляет 12 мДа (240×50). Таким образом, для пересчета количества E2 белка в массу цельновирионного препарата необходимо использовать коэффициент 4,33 (52/12).

Для проверки коэффициента, используемого при расчете массы цельновирионного антигена, массу вирусных частиц рассчитывали двумя способами. В первом способе исходили из количества геномных эквивалентов на 1 мл (ГЭ/мл) исследуемого образца, определенных методом ОТ-кПЦР-РВ, подразумевая, что один ГЭ соответствует одной вирусной частице. Во втором способе расчет проводили по массе E2 белка, определенной в количественном ИФА, и умножали это значение на рассчитанный коэффициент. Для чистоты эксперимента

культуральную жидкость, содержащую ВЧИК, разделяли на четыре части: две части обрабатывали РНКазой (50 мкг/мл), а другие две части не обрабатывали (вместо РНКазы добавляли эквивалентный объем ФСБ). Все образцы анализировали обоими методами. Целью предварительной обработки ВСЖ РНКазой было удаление всей свободной вирусной РНК, при этом РНК внутри вирионов оставалась защищенной от фермента, что позволило нам точно определить количество ГЭ/мл методом ОТ-кПЦР-РВ и фактическую массу цельновирионного антигена в образце.

Вес одной вирусной частицы, как было отмечено выше, составляет 52 мДа, или $8,64 \times 10^{-17}$ г. С учетом пересчета разведений при выделении РНК, постановке обратной транскрипции и ПЦР в ВСЖ нами было выявлено $1,26 \times 10^{10}$ ГЭ/мл, или 1,09 мкг/мл ($1,26 \times 10^{10} \times 8,64 \times 10^{-17} = 1,09 \times 10^{-6}$ г).

Результаты количественного ИФА указали на то, что содержание E2 белка в этих же образцах составляет 244,64 нг/мл (табл. 2). Для пересчета концентрации E2 антигена в массу цельновирионного препарата использовали коэффициент 4,33 ($4,33 \times 244,64 = 1059$ нг/мл $\approx 1,06$ мкг/мл).

При расчете концентрации цельновирионного антигена в двух образцах, не обработанных РНКазой, получено два значения: 2,99 мкг/мл

Таблица 2. Расчет массы цельновирионного антигена в образцах ВСЖ, обработанных и не обработанных РНКазой
Table 2. Calculation of the mass of whole-virion antigen in RNase-treated and non-treated VCF samples

ОТ-ПЦР в реальном времени <i>Real-time RT-PCR</i>			ИФА <i>ELISA</i>		
Параметр <i>Parameter</i>	ВСЖ с РНКазой <i>VCF with RNase</i>	ВСЖ с ФСБ <i>VCF with PBS</i>	Параметр <i>Parameter</i>	ВСЖ с РНКазой <i>VCF with RNase</i>	ВСЖ с ФСБ <i>VCF with PBS</i>
Уравнение калибровки <i>Calibration equation</i>	$y = -3,6357x + 53,221$ $R^2 = 0,9991$		Уравнение калибровки <i>Calibration equation</i>	$y = 6,448x + 1,0025$ $R^2 = 0,9969$	
Среднее значение $Ct \pm SD$ <i>Mean Ct $\pm SD$</i>	17,6 \pm 0,36	16,0 \pm 0,20	Среднее значение $OP_{450} \pm SD$ <i>Mean $OD_{450} \pm SD$</i>	3,64 \pm 0,26	3,59 \pm 0,27
Ig(ГЭ/мл) $\pm SD$ <i>Ig(GE/mL) $\pm SD$</i>	9,80 \pm 0,10	10,24 \pm 0,06	Конц. ^b Аг ВЧИК (нг/мл) $\pm SD$ <i>CHIKV E2 concentration^b (ng/mL) $\pm SD$</i>	244,64 \pm 16,90	241,59 \pm 17,60
ГЭ/мл $\pm SD$ ^a <i>GE/mL $\pm SD$^a</i>	1,26 $\times 10^{10} \pm$ 0,26 $\times 10^{10}$	3,46 $\times 10^{10} \pm$ 0,43 $\times 10^{10}$	Конц. Аг ВЧИК (нг/мл) $\pm SD$ <i>CHIKV E2 concentration (ng/mL) $\pm SD$</i>	1059,29 \pm 73,29	1046,09 \pm 76,27
Конц. Аг ВЧИК (мкг/мл) $\pm SD$ <i>CHIKV E2 concentration (μg/mL) $\pm SD$</i>	1,090 \pm 0,001	2,990 \pm 0,002	Конц. Аг ВЧИК (мкг/мл) $\pm SD$ <i>CHIKV E2 concentration (μg/mL) $\pm SD$</i>	1,060 \pm 0,073	1,050 \pm 0,076

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

Примечание. ОТ-ПЦР – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ИФА – иммуноферментный анализ; ВСЖ – вирусодержащая жидкость; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; R^2 – коэффициент детерминации; Ct – пороговый цикл; OP_{450} – оптическая плотность при 450 нм; SD – стандартное отклонение; Аг – E2 антиген; ВЧИК – вирус Чикунгунья; ГЭ – геном-эквивалент; Конц. – концентрация.

^a умножали полученное значение ГЭ на коэффициент разведения 2.

^b умножали концентрацию E2 антигена на коэффициент разведения 10.

Note. RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; VCF, virus-containing fluid; PBS, phosphate-buffered saline; R^2 , coefficient of determination; Ct , cycle threshold; OD_{450} , optical density at 450 nm; SD , standard deviation; CHIKV, Chikungunya virus; GE, genomic equivalent.

^a The GE value obtained was multiplied by a dilution factor of 2.

^b The E2 concentration was multiplied by a dilution factor of 10.

(данные ОТ-кПЦР-РВ) и 1,05 мкг/мл (данные ИФА). Отметим, что по данным ОТ-кПЦР-РВ расчетное значение концентрации антигена без обработки образца РНКазой превышало почти в 2 раза концентрацию, установленную в ИФА. Это объясняется большим количеством вирусной РНК в ВСЖ, которая присутствует как в виде свободной РНК, вышедшей из разрушенных клеток, так и РНК, заключенной внутри вирусных частиц. Тогда как в ИФА обработка ВСЖ РНКазой не влияет на полученный результат (разница не превышает 1%).

Таким образом, при сравнении двух количественных методов, ИФА и ОТ-кПЦР-РВ с обработкой РНКазой образцов и последующим пересчетом в массу цельновирионного препарата, нами были получены схожие результаты: 1,06 и 1,09 мкг/мл соответственно. Разница в концентрациях не превышает 3% и является незначительной, что свидетельствует о возможности использования коэффициента 4,33 для пересчета массы E2 белка ВЧИК в массу цельновирионного антигена.

При расчете коэффициента корреляции Пирсона с использованием стандартного па-

кета программ Microsoft Office Excel 2016 было получено значение $r_{xy} = -0,94$. Это указывает на то, что между значениями оптической плотности и пороговыми циклами, полученными с помощью двух методов, существует очень сильная обратная корреляция ($0,9 < r < 1$ по шкале Чеддока).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная ИФА тест-система для количественного выявления поверхностного E2 антигена ВЧИК показала высокую эффективность: аналитическая чувствительность метода составила не более 0,625 нг/мл; тест на «линейность» в диапазоне концентраций 1,5–16 нг/мл допустим в пределах 90–110%; среднее значение коэффициента вариации составило 3,56%; тест на «открытие» – 100%. Специфичность ИФА составила 100%, перекрестная реактивность не наблюдалась с образцами, содержащими вирусы денге, желтой лихорадки, Синдбис, краснухи и вирус Западного Нила. Рассчитанный коэффициент пересчета концентрации E2 белка ВЧИК в цельновирионный антиген составил 4,33. С помощью него можно вычислить значения, достоверно близкие значениям, полученным

при пересчете массы вирионов с использованием геномных эквивалентов на 1 мл. Это позволяет говорить о применимости обеих методик расчета на практике, в частности при разработке вакцин, основанных на цельновирионном антигене. При статистическом анализе обнаружена прямая зависимость между двумя количественными методами, ИФА и ОТ-кПЦР-РВ, а также сильная обратная корреляция ($r_{xy} = -0,94$)

между значениями оптической плотности и пороговыми циклами.

Таким образом, разработанная ИФА тест-система для количественного определения E2 антигена ВЧИК в комплексе с методикой пересчета в цельновирионный антиген помогут внести серьезный вклад в разработку вакцинных препаратов и позволят повысить качество и точность дозировки специфического антигена.

Литература/References

- Moizés RN, Fernandes TA, Guedes PM, Pereira HW, Lanza DC, Azevedo JW, et al. Chikungunya fever: A threat to global public health. *Pathog Glob Health*. 2018;112(4):182–94. <https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1478777>
- de Souza WM, de Lima ST, Mello LM, Candido DS, Buss L, Whittaker C, et al. Spatiotemporal dynamics and recurrence of chikungunya virus in Brazil: An epidemiological study. *Lancet Microbe*. 2023;4(5):e319–29. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00033-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00033-2)
- Andrew A, Navien TN, Yeoh, TS, Citartan M, Mangantig E, Sum MS, Tang TH. Diagnostic accuracy of serological tests for the diagnosis of Chikungunya virus infection: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022;16(2):e0010152. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010152>
- Vu DM, Jungkind D, LaBeaud AD. Chikungunya virus. *Clin Lab Med*. 2017;37(2):371–82. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.008>
- Kendall C, Khalid H, Müller M, Banda DH, Kohl A, Merits A, et al. Structural and phenotypic analysis of Chikungunya virus RNA replication elements. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(17):9296–312. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz640>
- Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog*. 2007;3(12):e201. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>
- Tsetsarkin KA, McGee CE, Volk SM, Vanlandingham DL, Weaver SC, Higgs S. Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaptation of chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes. *PLoS One*. 2009;4(8):e6835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006835>
- Deeba F, Haider MS, Ahmed A, Tazeen A, Faizan MI, Salam N, et al. Global transmission and evolutionary dynamics of the Chikungunya virus. *Epidemiol Infect*. 2020;148:e63. <https://doi.org/10.1017/S0950268820000497>
- Montalvo ZFG, Reyes-Sandoval A, Kim YC. Chikungunya virus: Priority pathogen or passing trend? *Vaccines*. 2023;11(3):568. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030568>
- Morrison TE. Reemergence of chikungunya virus. *J Virol*. 2014;88(20):11644–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.01432-14>
- Ingoba LL, Adedoja A, Peko SM, Vairo F, Haider N, Kock R, Ntoumi F. Diagnosis of Chikungunya virus in febrile patients from a malaria holoendemic area. *Int J Infect Dis*. 2021;109:247–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.06.043>
- Dayakar S, Goud IK, Pillai H, Remadevi V, Dharmaseelan S, Nair RR, Pillai MR. Molecular diagnosis of Chikungunya virus (CHIKV) and dengue virus (DENV) and its concomitant circulation in South Indian population. *Viral Rep*. 2015;5:56–62. <https://doi.org/10.1016/j.virep.2015.05.001>
- Beltrán-Silva SL, Chacón-Hernández SS, Moreno-Palacios E, Pereyra-Molina JA. Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. *Rev Med Hosp Gen (Mex)*. 2018;81(3):146–55. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.011>
- Ravindran S, Lahon A. Tropism and immune response of Chikungunya and Zika viruses: An overview. *Cytokine*. 2023;170:156327. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2023.156327>
- Simo FBN, Burt FJ, Makoah NA. Chikungunya virus diagnosis: A review of current antigen detection methods. *Trop Med Infect Dis*. 2023;8(7):365. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8070365>
- Musso D, Gubler DJ. Zika virus: Following the path of Dengue and Chikungunya? *Lancet*. 2015;386(9990):243–4. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61273-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61273-9)
- Замарина ТВ, Пименова ЕВ, Храпова НП, Батурин АА. Современное состояние лабораторной диагностики лихорадки чикунгунья (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66(9):558–64. Zamarina TV, Pimenova EV, Khrapova NP, Baturin AA. Current state of Chikungunya fever laboratory diagnosis (review of literature). *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2021;66(9):558–64 (In Russ.). <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-558-564>
- Burdino E, Calleri G, Caramello P, Ghisetti V. Unmet needs for a rapid diagnosis of Chikungunya virus infection. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(10):1837–9. <https://doi.org/10.3201/eid2210.151784>
- Segato-Vendrameto CZ, Zanluca C, Zucoloto AZ, Zaninelli TH, Bertozzi MM, Saraiva-Santos T, et al. Chikungunya virus and its envelope protein E2 induce hyperalgesia in mice: Inhibition by anti-E2 monoclonal antibodies and by targeting TRPV1. *Cells*. 2023;12(4):556. <https://doi.org/10.3390/cells12040556>
- Powers AM. Vaccine and therapeutic options to control Chikungunya virus. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(1):e00104–16. <https://doi.org/10.1128/cmr.00104-16>
- Subudhi BB, Chattopadhyay S, Mishra P, Kumar A. Current strategies for inhibition of chikungunya infection. *Viruses*. 2018;10(5):235. <https://doi.org/10.3390/v10050235>
- Sofyantoro F, Frediansyah A, Priyono DS, Putri WA, Septriani NI, Wijayanti N, et al. Growth in Chikungunya virus-related research in ASEAN and South Asian countries from 1967 to 2022 following disease emergence: A bibliometric and graphical analysis. *Global Health*. 2023;19(1):9. <https://doi.org/10.1186/s12992-023-00906-z>
- Игнатьев ГМ, Оксанич АС, Казакова ЕВ, Самарцева ТГ, Отрашевская ЕВ, Уйба СВ, Трухин ВП. Изоляция и генетический анализ вируса Чикунгунья из комаров *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):310–18. Ignatyev GM, Oksanich AS, Kazakova EV, Samartseva TG, Otrashesvskaya EV, Uyba SV, Trukhin VP. Isolation and genetic analysis of the chikungunya virus from *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes captured in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(5):310–18 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-354>
- Mardekian SK, Roberts AL. Diagnostic options and challenges for Dengue and Chikungunya viruses. *Biomed Res Int*. 2015;2015(1):834371. <https://doi.org/10.1155/2015/834371>
- Johnson BW, Russell BJ, Goodman CH. Laboratory diagnosis of Chikungunya virus infections and commercial sources for diagnostic assays. *J Infect Dis*. 2016;214(suppl_5):S471–4. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw274>
- Kumar J, Khan M, Gupta G, Bhoopati M, Lakshmana Rao PV, Parida M. Production, characterization, and application of monoclonal antibodies specific to recombinant (E2) structural protein in antigen-capture ELISA for clinical diagnosis

- of Chikungunya virus. *Viral Immunol.* 2012;25(2):153–60. <https://doi.org/10.1089/vim.2011.0068>
27. Shukla J, Khan M, Tiwari M, Sannarangaiah S, Sharma S, Rao PV, Parida M. Development and evaluation of antigen capture ELISA for early clinical diagnosis of Chikungunya. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;65(2):142–9. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.06.017>
 28. Verma A, Chandele A, Nayak K, Kaja MK, Arulandu A, Lodha R, Ray P. High yield expression and purification of Chikungunya virus E2 recombinant protein and its evaluation for serodiagnosis. *J Virol Methods.* 2016;235:73–9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.05.003>
 29. Weber C, Berberich E, von Rhein C, Henß L, Hildt E, Schnierle BS. Identification of functional determinants in the Chikungunya virus E2 protein. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(1):e0005318. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005318>
 30. Goh LY, Kam YW, Metz SW, Hobson-Peters J, Prow NA, McCarthy S, et al. A sensitive epitope-blocking ELISA for the detection of Chikungunya virus-specific antibodies in patients. *J Virol Methods.* 2015;222:55–61. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.05.011>
 31. Guo M, Du S, Lai L, Wu W, Huang X, Li A, et al. Development and evaluation of recombinant E2 protein based IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and double antigen sandwich ELISA for detection of antibodies to Chikungunya virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022;16(12):e0010829. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010829>
 32. Kim J, Yang J, Kim YB, Lee HJ, Kim S, Poo H. Development of a specific CHIKV-E2 monoclonal antibody for Chikungunya diagnosis. *Virol Sin.* 2019;34(5):563–71. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00135-y>
 33. Оксанич АС, Самарцева ТГ, Каа КВ, Отрашевская ЕВ, Красько АГ, Лапутина АГ и др. Молекулярно-генетические методы контроля качества инактивированных вакцин на модели вируса Чикунгунья: подлинность штамма и полнота инактивации вируса. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2024;24(3):279–93. Oksanich AS, Samartseva TG, Kaa KV, Otrashesvskaia EV, Krasko AG, Laputina AG, et al. Molecular genetic methods for quality control of inactivated vaccines using a Chikungunya virus model: Vaccine strain identification and completeness of virus inactivation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2024;24(3):279–93 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-279-293>
 34. Frolov I, Frolova EI. Molecular virology of Chikungunya virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2022;435:1–31. https://doi.org/10.1007/82_2018_146
 35. Delang L, Li C, Tas A, Quérat G, Albulescu IC, De Burghgraeve T, et al. The viral capping enzyme nsP1: A novel target for the inhibition of Chikungunya virus infection. *Sci Rep.* 2016;6(1):31819. <https://doi.org/10.1038/srep31819>
 36. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 2009;4(7):837–56. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.59>
 37. Sharma R, Kesari P, Kumar P, Tomar S. Structure-function insights into Chikungunya virus capsid protein: Small molecules targeting capsid hydrophobic pocket. *Virology.* 2018;515:223–34. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.020>
 38. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: Gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev.* 1994;58(3):491–562. <https://doi.org/10.1128/mr.58.3.491-562.1994>
 39. Wu L, Xu Y, Zhao H, Li Y. RNase T2 in inflammation and cancer: Immunological and biological views. *Front Immunol.* 2020;11:1554. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01554>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены таблицы S1–S4.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632-table-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632-table-s2>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632-table-s3>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632-table-s4>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Б. Тахан** – постановка экспериментов, написание текста рукописи, формулировка выводов; **Л.Н. Прутворова** – тестирование моноклональных антител, планирование экспериментов по оценке эффективности ИФА; **Т.Г. Самарцева** – конструирование калибратора ПЦР, отработка методики ОТ-кПЦР-РВ; **С.А. Кедик** – обоснование концепции исследования, критический пересмотр текста рукописи; **А.С. Оксанич** – планирование исследования, оценка и обобщение результатов экспериментов, написание и редактирование текста рукописи, формулировка выводов.

Additional information. Tables S1–S4 are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.*

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632-table-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632-table-s2>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632-table-s3>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-632-table-s4>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **B. Tahhan** performed experiments, wrote the manuscript, formulated conclusions. **L.N. Pritvorova** tested monoclonal antibodies, planned the experiments to evaluate the effectiveness of ELISA. **T.G. Samartseva** constructed a PCR calibrator and developed the RT-qPCR-RT technique. **S.A. Kedik** substantiated the study concept and critically revised the manuscript. **A.S. Oksanich** planned the study, evaluated and summarised the experimental results, wrote and edited the manuscript, and formulated conclusions.

Об авторах / Authors

Тахан Бана / Vana Tahhan

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-9604-0139>

Прутворова Людмила Николаевна, канд. мед. наук / **Lyudmila N. Pritvorova**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2997-8892>

Самарцева Татьяна Геннадьевна / Tatiana G. Samartseva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Кедик Станислав Анатольевич, д-р техн. наук, проф. / **Stanislav A. Kedik**, Dr. Sci. (Tech.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>

Оксанич Алексей Сергеевич, канд. биол. наук / **Alexey S. Oksanich**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>

Поступила 08.11.2024

После доработки 12.02.2025

Принята к публикации 21.03.2025

Online first 10.06.2025

Received 8 November 2024

Revised 12 February 2025

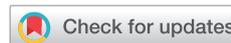
Accepted 21 March 2025

Online first 10 June 2025

УДК 615.065:615.072

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-552>

Оригинальная статья | Original article



Детекция антилекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа

В.В. Писарев , А.В. Иванов

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственный центр Пробиотек», ул. 5-я Кабельная, д. 2-Б, стр. 1, Москва, 111024, Российская Федерация

✉ Писарев Владимир Викторович; vladimir.pisarev@probiotech.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Трастузумаб — препарат на основе рекомбинантных гуманизированных моноклональных антител к HER2, показан для таргетной терапии HER2⁺ рака молочной железы. Применение трастузумаба стало рутинной практикой в лечении рака и позволяет повысить общую выживаемость пациенток. Однако в ряде случаев трастузумаб способен вызывать появление антилекарственных антител (АЛА), снижающих эффективность таргетной терапии. По этой причине своевременное выявление АЛА в сыворотке крови необходимо для возможной коррекции терапии.

ЦЕЛЬ. Разработка и валидация методики полуколичественного определения общих АЛА к трастузумабу в биологических жидкостях методом твердофазного иммуноферментного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Тест-система представлена в виде классического ИФА-набора, в состав которого входят 96-луночный планшет с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок трастузумабом, раствор вторичных антител (трастузумаб, конъюгированный с пероксидазой хрена), субстратный раствор (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) и стоп-раствор. Оптическую плотность определяли с помощью планшетного фотометра при длине волны 450 нм. Растворы для контроля качества готовили путем разведения моноклональных антител к трастузумабу в буферном растворе, содержащем сыворотку крови человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Наименьшая определяемая концентрация АЛА составила 2 нг/мл при 2-кратном значении показателя минимального необходимого разведения. Методика устойчива к наличию 116 нг/мл трастузумаба при уровне 16 нг/мл АЛА и 1000 нг/мл трастузумаба при уровне 100 нг/мл АЛА. Доказана специфичность, селективность и прецизионность методики внутри одной аналитической серии, а также между разными сериями. Вероятность «хук»-эффекта от избыточных концентраций АЛА исключается в диапазоне от 0,16 до 640 нг/мл. Продемонстрирована краткосрочная стабильность АЛА в образцах в течение 6 ч при комнатной температуре, долгосрочная стабильность при хранении образцов при минус 70 °С в течение 90 сут и стабильность при трех циклах замораживания до минус 70 °С (по 12 ч) и оттаивания.

ВЫВОДЫ. Установленные параметры представленной тест-системы свидетельствуют о возможности ее применения для выявления антилекарственных антител к трастузумабу в биологических жидкостях при таргетной терапии.

Ключевые слова: трастузумаб; антилекарственные антитела; ИФА; валидация; тест-система; HER2; рак молочной железы; сыворотка крови

Для цитирования: Писарев В.В., Иванов А.В. Детекция антилекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2025;25(2):226–238. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-552>

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки, выполнено за счет ООО «Научно-производственный центр Пробиотек».
Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

© В.В. Писарев, А.В. Иванов, 2025

Detection of anti-drug antibodies to trastuzumab in serum by enzyme-linked immunosorbent assay

Vladimir V. Pisarev✉, Andrei V. Ivanov

Scientific and Production Center Probiotech LLC, 2B bld. 1, 5th Kabelnaya St., Moscow 111024, Russian Federation

✉ Vladimir V. Pisarev; vladimir.pisarev@probiotech.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Trastuzumab is a recombinant humanised monoclonal antibody against human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) approved as targeted therapy for patients with HER2-positive breast cancer. Improving overall patient survival, trastuzumab has become a standard of care in cancer treatment. However, trastuzumab can induce anti-drug antibodies (ADAs), which can reduce the effectiveness of treatment. Therefore, timely detection of serum ADAs is necessary for potential treatment adjustment.

AIM. This study aimed to develop and validate an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for semiquantitative determination of all-class anti-trastuzumab ADAs.

MATERIALS AND METHODS. The presented test system is a classic ELISA kit comprising a 96-well plate with trastuzumab immobilised on the inner surface of the wells, a solution of secondary antibody (trastuzumab conjugated with horseradish peroxidase), a substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), and a stop solution. The authors determined the optical density at 450 nm using a microplate photometer. Quality control solutions were prepared by diluting monoclonal antibodies against trastuzumab with a buffer containing human serum.

RESULTS. The limit of quantification for ADAs is 2 ng/mL, and the minimum required dilution is 1:2. The assay is tolerant to trastuzumab concentrations of 116 ng/mL and 1000 ng/mL and can detect ADA levels of 16 ng/mL and 100 ng/mL, respectively, in the presence of trastuzumab. The analytical procedure provides results with acceptable specificity, selectivity, and within-run and between-run precision. The assay can measure ADA concentrations ranging from 640 ng/mL to 0.16 ng/mL without exhibiting the hook effect from excess ADA levels. ADAs are stable for 6 hours at room temperature, 90 days at -70 °C, and three freeze-thaw cycles with 12-hour periods at -70 °C.

CONCLUSIONS. The test system parameters established in this study confirm the applicability of the system for detecting ADAs against trastuzumab in biological fluids during targeted therapy.

Keywords: trastuzumab; anti-drug antibody; ELISA; validation; test system; HER2; breast cancer; blood serum

For citation: Pisarev V.V., Ivanov A.V. Detection of anti-drug antibodies to trastuzumab in serum by enzyme-linked immunosorbent assay. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2025;25(2):226–238. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-552>

Funding. The study was performed at the expense of Probiotech LLC without external funding.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Список сокращений

CCP (confirmatory cut point) – предел исключения подтверждающего метода;
CV – коэффициент вариации;
FSCP (floating screening cut point) – плавающий предел исключения;
mAb (monoclonal antibody) – моноклональные антитела;

PSCP (plate-specific cut point) – предел исключения для каждой аналитической серии;
SCP (screening cut point) – фиксированный предел исключения;
АЛА – антилекарственные антитела;
ВПК – верхний положительный контроль;
ИФА – иммуноферментный анализ;
КП – коэффициент позитивности;

МНР – минимальное необходимое разведение;
НК – негативный контроль (отрицательный контроль);
НОК – наименьшая определяемая концентрация;
НПК – нижний положительный контроль;

ОП – оптическая плотность;
ПК – положительный контроль;
РМЖ – рак молочной железы;
СПК – средний положительный контроль;
ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным онкологическим заболеванием у женщин и остается вторым по смертности среди всех онкологических заболеваний, несмотря на достигнутый за последние десятилетия прогресс в его лечении и диагностике. Природа и молекулярные причины возникновения и прогрессии РМЖ достаточно гетерогенны, при этом одним из наиболее неблагоприятных вариантов до конца XX века считался РМЖ, ассоциированный с гиперэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста человека типа 2 (HER2). Распространенность HER2-позитивного РМЖ (HER2⁺ РМЖ) составляет 20–30% от всех случаев РМЖ [1]. HER2 является трансмембранной тирозин-специфичной протеинкиназой и способствует передаче межклеточных сигналов по каскадам PI3K-Akt и RAS-MAPK. В норме на поверхности эпителиальных клеток молочных желез, яичников, печени и почек находится крайне незначительное количество молекул HER2 (около 20 тыс. на клетку). В случаях злокачественного перерождения с участием HER2 на поверхности малигнизированной клетки выявляется до 2 млн молекул HER2 [2]. В результате клетки утрачивают контроль над прохождением клеточного цикла и происходит их неконтролируемая пролиферация. Карциномы с амплификацией гена *HER2 (ERBB2)* и, как следствие, высокой представленностью рецепторов на поверхности клеток, особенно димеризованных с другими рецепторами семейства HER, характеризуются резистентностью к стандартным режимам цитостатической терапии [3, 4]. В результате происходит быстрая генерализация опухолевого процесса.

Долгое время HER2⁺ РМЖ считался одним из наиболее агрессивных подтипов с неблагоприятным прогнозом. Данную ситуацию переломило появление таргетной терапии, основанной на иммунологическом блокировании молекул HER2 посредством связывания мышиного моноклонального антитела (monoclonal antibody, mAb) 4D5 с внеклеточным доменом HER2. В дальнейшем 95% аминокислотных последовательностей такого антитела (кроме непосредственно

антигенсвязывающего участка) были заменены на человеческие, в результате чего был создан первый генно-инженерный препарат для лечения РМЖ – трастузумаб. Трастузумаб блокирует передачу сигнала с внутриклеточного домена HER2 на нижележащие регуляторные каскады. Раковая клетка останавливается в фазе G1 интерфазы, что тормозит неконтролируемую пролиферацию. Трастузумаб подавляет ангиогенез и активирует антителозависимую клеточную цитотоксичность [5] (включает натуральные киллеры, макрофаги, нейтрофилы и эозинофилы), приводящую к общей активации иммунной системы организма.

Подобные свойства трастузумаба позволили продемонстрировать результаты достаточно эффективной терапии HER2⁺ злокачественных новообразований, особенно в комбинации с классическими химиотерапевтическими агентами, 5-фторурацилом и препаратами платины [6]. Трастузумаб включен ВОЗ в список жизненно необходимых препаратов для лечения HER2⁺ РМЖ¹. Согласно многолетним наблюдениям клиническое применение трастузумаба обладает рядом особенностей [7]. Так как препараты mAb, в том числе трастузумаб, являются чужеродными молекулами белковой природы, их введение в организм человека способно вызвать активацию гуморального иммунитета и секрецию В-лимфоцитами антилекарственных антител (АЛА). Феномен АЛА для терапевтических mAb был обнаружен вскоре после начала применения данного класса препаратов [8, 9]. В результате нейтрализации mAb отмечено снижение эффективности их применения, особенно у людей с аутоиммунными заболеваниями и дисфункцией иммунной системы [10]. Применение метода компьютерной симуляции (Simcyp-коррелированный алгоритм Монте-Карло) иммуногенности к белковым препаратам на основе антител показало, что 89% таких препаратов могут вызывать появление АЛА, которые в 49% случаев снижают эффективность применения препарата [11].

АЛА к трастузумабу впервые описаны в исследовании P. Pohlmann с соавт. [12]. Padrón с соавт. [13] отметили, что появление АЛА

¹ Model list of essential medicines. 21st List. WHO; 2019.

к трастузумабу сопровождается формированием иммунных комплексов, которые блокируют действие препарата и достаточно быстро выводятся из организма. Данное событие препятствует связыванию трастузумаба с HER2, что приводит к ограничению его фармакологического эффекта.

Частота возникновения АЛА к трастузумабу и его биоаналогам у пациенток с HER2⁺ РМЖ составляет по разным оценкам от 1 до 1,5% [14, 15]. Тем не менее рекомендовано принимать во внимание потенциальную иммуногенность трастузумаба при клиническом применении, так как АЛА могут вызвать серьезные побочные эффекты и/или резистентность к трастузумабу.

Для выявления АЛА к трастузумабу успешно применяется метод иммуноферментного анализа (ИФА). Так, в подходе, предложенном N. Nath с соавт. [16], применен вариант мостикового ИФА (bioluminescent bridging immunoassay) с использованием в качестве репортера целентеразин-зависимой люциферазы NanoLuc с улучшенными характеристиками свечения. Особенностью такого ИФА является двойной антиидиотипический захват АЛА между иммобилизованными на подложке и вторичными мечеными антителами с антителом-мишенью в качестве мостика. В данном случае чувствительность метода достигает 100 нг/мл общих АЛА при 500-кратном избытке свободного препарата в сыворотке крови.

Преимущества метода ИФА для анализа содержания препаратов иммунологической природы в биологических жидкостях человека заключаются в высокой чувствительности и специфичности, а также возможности его рутинного использования в диагностических лабораториях. Это обусловило разработку и появление на рынке значительного количества зарубежных и отечественных тест-систем. Так, для трастузумаба разработаны и валидированы тест-системы на основе ИФА [17, 18]. В то же время тест-система для определения АЛА к трастузумабу является принципиально новым биотехнологическим продуктом, позволяющим поставить мониторинг эффективности таргетной терапии РМЖ на качественно новый уровень. Особенно перспективным представляется подход с одновременным измерением концентраций препарата на основе mAb и АЛА к нему в крови пациента.

Цель работы – разработка и валидация методики полуколичественного определения общих АЛА к трастузумабу в биологических жидкостях

методом твердофазного иммуноферментного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Тест-система разработана из отдельных компонентов и представлена в виде классического набора для ИФА. Набор состоит из 96-луночного планшета, покрытого первичными антителами (трастузумаб); раствора вторичных (детектирующих) антител, конъюгированных с пероксидазой хрена; субстратного раствора (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, ТМБ) и стоп-раствора (1М серная кислота, «Химмед», Россия). При постановке варианта теста «с гидролизом» (табл. 1) на стадии пробоподготовки для разведения проб дополнительно используют планшет с поверхностью из несорбирующего полистирола. В состав набора также входит концентрат промывочного буферного раствора, адгезивная пленка и комплект документации (инструкция и паспорт).

Образцами для контроля качества служили растворы mAb к трастузумабу HCA177 (Bio-Rad, Великобритания)² в исходной концентрации 0,5 мг/мл. Образцы положительного контроля (ПК) готовили путем смешивания рабочих растворов HCA177 с предварительно разведенной сывороткой крови. В качестве исходного раствора трастузумаба использовали медицинский препарат Герцептин (Герцептин®, F.Hoffmann-La Roche, Швейцария) в концентрации 15 мг/мл. Для оценки селективности методики использовали исходный раствор пертузумаба (Перьета®, Roche Diagnostics, Германия) в концентрации 30 мг/мл.

Образцы сыворотки крови человека, использованные для приготовления образцов для контроля качества и бланковых сывороток, были предоставлены для научных исследований ГКУЗ Тверской области «Станция переливания крови» Министерства здравоохранения Тверской области.

Оборудование

Оптическую плотность (ОП) образцов (далее – отклик образцов) измеряли с помощью планшетного фотометра Multiskan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 450 нм.

В работе использовали центрифугу MiniSpin (Eppendorf, Германия), термошейкер PST-60HL (BioSan, Латвия), дозаторы объемами 0,5–10, 2–20 и 10–200 мкл, автоматический промыватель планшетов HydroFlex (Tecan, Швейцария),

² <https://images.bio-rad-antibodies.com/datasheets/datasheet-HCA177.pdf>

Таблица 1. Основные этапы используемых вариантов теста
Table 1. Main stages for test versions

№ этапа Stage No.	Наименование этапа Stage name	Прямой анализ Direct analysis	Анализ с гидролизом Analysis with dissociation
1	Подготовка и внесение <i>Sample preparation and plating</i>	В каждую лунку ПСТ вносят по 100 мкл образца (контрольного и исследуемого). Используют дозатор со сменными наконечниками <i>Add 100 µL of sample (control and test) to each well of the PWT. Use pipettes with disposable tips</i>	1а. В каждую лунку несорбирующего планшета для подготовки вносят по 30 мкл образца и 30 мкл разбавителя 1б. Перемешивают на шейкере в течение 1 мин при 600 об/мин 1с. Добавляют по 120 мкл глицинового буфера 1д. Инкубируют в течение 30 мин при 37 °С на шейкере при 600 об/мин 1е. Вносят по 100 мкл подготовленного образца из каждой лунки в ПСТ 1ф. Добавляют по 50 мкл 1М Трис (рН 9,5) <i>1a. Add 30 µL of sample and 30 µL of diluent to each well of a non-absorbent preparation plate</i> <i>1b. Shake for 1 min at 600 rpm</i> <i>1c. Add 120 µL of glycine buffer</i> <i>1d. Incubate for 30 min at 37 °C with shaking at 600 rpm</i> <i>1e. Add 100 µL of the prepared sample from each well to the PWT</i> <i>1f. Add 50 µL of 1M TRIS (pH 9,5)</i>
2	Первая инкубация <i>Incubation 1</i>	Заклеивают пленкой, инкубируют в течение 60 мин при 37 °С на шейкере при 600 об/мин <i>Cover with film and incubate for 60 min at 37 °C with shaking at 600 rpm</i>	
3	Первая промывка <i>Wash 1</i>	Удаляют содержимое и трижды промывают промывочным буфером <i>Remove contents and wash three times with wash buffer</i>	
4	Вторая инкубация с мечеными антителами <i>Incubation 2, with labelled antibodies</i>	Вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, инкубируют в течение 60 мин при 37 °С на шейкере при 600 об/мин <i>Add 100 µL of conjugate working solution and incubate for 60 min at 37 °C with shaking at 600 rpm</i>	
5	Вторая промывка <i>Wash 2</i>	Удаляют содержимое и трижды промывают промывочным буфером <i>Remove contents and wash three times with wash buffer</i>	
6	Реакция с субстратом ТМБ <i>Reaction with TMB substrate</i>	Вносят по 100 мкл субстратного раствора ТМБ. Инкубируют в течение 15 мин при 37 °С в темноте <i>Add 100 µL of TMB substrate solution. Incubate for 15 min at 37 °C in the dark</i>	
7	Остановка реакции <i>Reaction quenching</i>	Вносят по 100 мкл стоп-раствора <i>Add 100 µL of stop solution</i>	
8	Измерение ОП <i>OD measurement</i>	Измеряют ОП на планшетном фотометре при длине волны 450 нм <i>Measure the OD on a microplate photometer at 450 nm</i>	
9	Интерпретация результата <i>Result interpretation</i>	Расчет концентрации антилекарственных антител к трастузумабу проводят с использованием программного обеспечения Scanit, Origin Pro, Magellan или подобного <i>Calculate concentrations of anti-drug antibodies to trastuzumab using Scanit, Origin Pro, Magellan, or similar software</i>	

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. ПСТ – планшет с трастузумабом; ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ОП – оптическая плотность.

Note. PWT, plate with trastuzumab; TMB, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; OD, optical density.

холодильную камеру +2–8 °С (Polair, Россия) и морозильную камеру (Liebherr, Германия).

Методы

Для проведения иммуноферментного анализа готовили следующие стандартные растворы:

1) промывочный буферный раствор – 0,01 М фосфатно-солевой буфер, ФСБ (рН 7,4±0,2), содержащий 0,025% Твин-20 (Sigma-Aldrich, США);

2) разбавитель, содержащий 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Твин-20 в ФСБ;

3) раствор вторичных (детектирующих) антител – конъюгат трастузумаба с пероксидазой

хрена («НПЦ Пробиотек», Россия) в разбавителе в разведении 1:33000 (разведение осуществляли в 2 этапа: сначала к 20 мкл раствора конъюгата трастузумаба с пероксидазой в глицерине добавляли 980 мкл разбавителя, затем 36 мкл полученного раствора разводили в 12 мл разбавителя);

4) стоп-раствор, содержащий 1 М серную кислоту;

5) глициновый буфер для гидролиза, содержащий 0,2 М глицина (Alfa Aesar, Германия);

6) 1 М Трис рН 9,5 (Panreac, Испания).

Проведение теста возможно в двух вариантах методической реализации: прямой анализ

и модифицированный анализ с диссоциацией (далее – анализ с гидролизом). Модифицированный анализ применяли для повышения толерантности к трастузумабу, для чего использовали кислотный гидролиз комплексов АЛА-трастузумаб с последующей частичной ассоциацией АЛА с трастузумабом, сорбированным на поверхности планшета. Для скринингового анализа целесообразно использовать прямой анализ, а для подтверждения – анализ с гидролизом. Основные этапы двух вариантов теста представлены в таблице 1.

Статистическая обработка данных. Выбор параметров валидации методики, включая все формулы вычисления пределов исключения, проводили согласно международному протоколу гармонизации исследований антилекарственных антител [19]. Для определения предела исключения и обнаружения выбросов применяли фильтрацию грубых промахов методом Тьюки³ внутри каждого индивидуального планшета. В случае вычисления скринингового предела исключения выбран плавающий предел исключения (FSCP), рассчитанный как разность между фиксированным пределом исключения (SCP), определенным в ходе данного теста, и средним значением аналитического сигнала негативного контроля (СрЗнач(НК)) между всеми группами по формуле (1):

$$FSCP = SCP - \text{СрЗнач(НК)}. \quad (1)$$

Фиксированный предел исключения для скринингового анализа определяли как 95-й процентиль откликов образцов, не содержащих антител к препарату из всех групп.

Предел исключения для каждой аналитической серии (PSCP) вычисляли как сумму плавающего предела исключения (FSCP) и среднего значения аналитического сигнала образца НК (СрЗнач(НК)) в этой серии по формуле (2):

$$PSCP = FSCP - \text{СрЗнач(НК)}. \quad (2)$$

Для вычисления предела исключения подтверждающего анализа определяли относительное ингибирование сигнала (далее – гашение сигнала) через отношение отклика образцов, содержащих избыток препарата (образцы «с гашением»), к отклику нативных образцов без добавления препарата по формуле (3):

$$\% \text{ Inhibition} = 100\% \times \left(1 - \frac{\text{InhibSampleAbsorbtion}}{\text{NativeSampleAbsorbtion}} \right), \quad (3)$$

где % *Inhibition* – относительное ингибирование сигнала; *Inhib Sample Absorbtion* – отклик образцов, содержащих избыток препарата; *Native Sample Absorbtion* – отклик нативных образцов без добавления препарата.

Коэффициент позитивности (КП) рассчитывали по формуле (4):

$$\text{КП} = \frac{\text{ОП}}{\text{ОП(НК)} + 0,18}, \quad (4)$$

где ОП – оптическая плотность пробы; ОП(НК) – оптическая плотность образца негативного контроля.

Для расчета оптической плотности (ОП) образцов применяли программное обеспечение Scanit для Microplate Reader v. 5.0 (Bio-Rad, Великобритания).

Для расчетов использовали программу Excel 2010 (Microsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно международным требованиям по валидации аналитических методик⁴, рекомендациям G. Shankar с соавт. [20] и протоколу H. Myler с соавт. [19], настоящее исследование состояло из следующих этапов: определение наименьшей определяемой концентрации (НОК); минимального необходимого разведения (МНР); влияния препарата; предела исключения скринингового метода; предела исключения подтверждающего метода; определения специфичности, селективности, прецизионности, «хук»-эффекта; краткосрочной и долгосрочной стабильности, а также стабильности при замораживании-оттаивании.

Тест-система представляет собой набор реактивов для полуколичественного выявления АЛА к трастузумабу оригинальной компоновки. Данный метод предусматривает вычисление отношения ОП экспериментальной пробы к определенному пороговому значению и вычисление КП. Исследование образцов включает следующие этапы.

1. Проведение скринингового анализа. Если величина ОП образца не превышает PSCP, образец признается отрицательным по наличию АЛА, в остальных случаях проводят подтверждающий анализ.

³ <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/prc/section4/prc471.htm>

⁴ Guideline on bioanalytical method validation. EMA; 2011.

Immunogenicity assessment for therapeutic protein products. FDA; 2014.

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

2. Проведение подтверждающего анализа. Если величина ОП образца при выполнении скрининга превышает PSCP, то вычисляют величину предела исключения подтверждающего метода (confirmatory cut point, CCP). В случае если относительное ингибирование сигнала образца не превышает величину CCP, образец также признается отрицательным по наличию АЛА. Если относительное ингибирование сигнала образца превосходит величину CCP, образец признается положительным по наличию АЛА.

Определение наименьшей определяемой концентрации

Наименьшую определяемую концентрацию (НОК) в буферном растворе вычисляли через соотношение отклика образца положительного контроля (ПК) различной концентрации к отклику образца, содержащего чистый разбавитель. Стоковый раствор HCA177 (1000 нг/мл) разводили до тех пор, пока среднее значение отклика образца, содержащего HCA177, не стало превышать значение отклика образца, содержащего чистый буферный раствор, ≥ 2 раза. Эксперименты проводили путем снижения концентраций в два этапа: первоначально с 1000 до 1,95 нг/мл и затем с 31,25 до 0,24 нг/мл. В результате значение НОК составило 2 нг/мл. В дальнейшем при проведении тестов на минимальное необходимое разведение и толерантность к препарату значение НОК (2 нг/мл) было подтверждено как в прямом анализе, так и в анализе с гидролизом.

Определение минимального необходимого разведения

Для определения минимального необходимого разведения (МНР) проанализировали образцы ПК, содержащие mAb в концентрациях от 0,5 до 125 нг/мл и разведенную в 2, 4 и 8 раз матрицу (цельная сыворотка крови, содержащая множество искажающих отклик компонентов). Критерием оценки служило ≥ 2 -кратное превышение отношения значений ОП образцов ПК и НК (ПК/НК). Результаты измерений образцов, содержащих разные концентрации mAb, представлены в *таблице S1⁵* (дополнительная информация).

Таким образом, по результатам теста значение МНР составило «2 раза», при этом было подтверждено, что концентрация антител 2 нг/мл соответствовала значению НОК. По сравнению с работой P. Pohlmann с соавт. [12], в которой значение МНР составило «10 раз», в представленной тест-системе достигнуты гораздо

лучшие показатели. Вероятной причиной является использование препарата антител HCA177, отсутствовавшего при первом описании АЛА к трастузумабу [12]. В ходе определения МНР установление значения НОК повторяли с использованием образцов ПК и НК, приготовленных из сыворотки крови с учетом МНР.

Оценка влияния лекарственного препарата на выявление АЛА

Поскольку антитела к трастузумабу, как правило, продолжают проявлять активность *in vitro*, необходимо принимать во внимание возможность получения ложноотрицательных результатов из-за нейтрализации активных центров антител свободными молекулами трастузумаба. Оценка влияния эффекта присутствия трастузумаба на возможность определения концентраций АЛА к нему выполняли по двум направлениям: определяли минимальную подавляющую концентрацию (МПК) и абсолютную подавляющую концентрацию (АПК).

Показатель МПК характеризует такую концентрацию лекарственного препарата в сыворотке крови, при которой определение АЛА к нему технически затруднено, так как сложно определить разницу между изначально пограничным уровнем аналитического сигнала АЛА и его подавлением ввиду наличия трастузумаба в концентрации выше АПК. Были проанализированы образцы ПК, содержащие АЛА в концентрациях от 100 до 4000 нг/мл и трастузумаб в концентрациях 100, 200, 500 и 1000 нг/мл. Данный диапазон концентраций включает ожидаемые концентрации трастузумаба в образцах сыворотки крови добровольцев при достижении максимального терапевтического эффекта препарата, когда появление АЛА наиболее вероятно. Критерием приемлемости служил отклик образца, содержавшего 4000 нг/мл HCA177, с добавлением искомой концентрации трастузумаба ниже величины 95-го перцентиля откликов образцов НК в той же серии. По результатам тестов определили, что методика устойчива к влиянию 116 нг/мл трастузумаба при уровне 16 нг/мл АЛА, а также устойчива к влиянию 1000 нг/мл трастузумаба при уровне 100 нг/мл АЛА. В качестве АПК выбрали 10 мкг/мл трастузумаба, что в 10 раз превышает его максимальную концентрацию, изученную в исследовании.

Расчет предела исключения

Было установлено, что значение показателя FSCP соответствовало 0,0028 единиц ОП. Предел исключения подтверждающего анализа

⁵ <https://data.mendeley.com/datasets/fvfp4htspn/2>

был определен как 99-й процентиль всех значений относительного ингибирования отклика образцов, не содержащих антител к препарату. Таким образом, значение показателя ССР составило 6,66%.

Оценка специфичности методики

Специфичность – возможность аналитической методики однозначно выявлять анализируемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов, даже близкого химического состава. Для проверки специфичности методики проанализировали 4 образца: образец НК (не содержал АЛА) и 3 образца ПК, содержавших различные концентрации НСА177, сыворотку крови и 100 мкг/мл пертузумаба (гуманизованное mAb к HER2 с аналогичными трастузумабу параметрами). Концентрации АЛА к трастузумабу в образцах ПК распределяли следующим образом: нижний положительный контроль (НПК) соответствовал двум значениям НОК (2×НОК), или 4 нг/мл; средний положительный контроль (СПК) – 16×НОК, или 32 мг/мл; верхний положительный контроль (ВПК) – 32×НОК, или 64 нг/мл. Всего выполнили 12 измерений образцов НК и 24 измерения 3 образцов ПК; для каждой измеренной концентрации АЛА в образцах вычисляли среднее значение ОП. Результаты измерений отклика образцов без добавления и с добавлением пертузумаба представлены в *таблице S2⁶* (дополнительная информация).

Для оценки специфичности методики применяли следующие критерии приемлемости: не менее 5 из 6 измерений индивидуальных образцов ПК оказались положительными при сравнении как со скрининговым, так и с подтверждающим пределом исключения, а все образцы НК были отрицательными при сравнении с подтверждающим пределом исключения. Согласно результатам проведенной оценки (*табл. S2*) (дополнительная информация) специфичность методики была доказана.

Оценка селективности методики

Селективность – характеристика методики, с помощью которой можно оценить стабильность аналитического сигнала исследуемого вещества при анализе различных источников, включая источники, содержащие помехи. Для оценки селективности методики применяли следующие критерии приемлемости: 1) не менее 80% индивидуальных бланковых образцов сыворотки крови имели отклик ниже скринингового предела исключения; 2) не менее 80% образцов

ПК демонстрировали среднее значение отклика выше или равное скрининговому пределу исключения при значении коэффициента вариации (coefficient of variation, CV) <20% между повторностями; 3) не менее 80% образцов ПК, приготовленных с использованием индивидуальных бланковых образцов сыворотки крови, характеризовались значением CV<20% между повторностями (для значения относительного ингибирования). Всего было проанализировано влияние 12 различных источников матрицы и образцы ПК, содержащие 2 разные концентрации АЛА к трастузумабу – НПК (4 нг/мл) и ВПК (64 нг/мл). Согласно результатам проведенной оценки методика соответствовала всем критериям приемлемости (*табл. S3*)⁷ (дополнительная информация) и была признана селективной.

Определение прецизионности внутри одной аналитической серии

Прецизионность методики внутри одной аналитической серии оценивали на основании анализа образцов ПК, содержащих три концентрации АЛА к трастузумабу: НПК (4 нг/мл), СПК (32 нг/мл) и ВПК (64 нг/мл). Всего исследовали 6 наборов образцов ПК «без гашения» (12 независимых повторов) и 3 набора образцов ПК «с гашением» (6 независимых повторов). Полученные результаты представлены в *таблице 2*. Прецизионность методики была доказана, так как результаты оценки удовлетворяли всем критериям приемлемости: значения CV<20% – для показателей ОП образцов каждого уровня ПК (НПК, СПК и ВПК) и НК; значения CV<20% – для показателей относительного ингибирования к каждому уровню образцов ПК; более чем 4 из 6 образцов ПК каждого уровня демонстрировали отклик, превышающий скрининговый предел исключения; значения отклика образца НПК были меньше отклика образца ВПК во всех случаях; не менее 2 из 3 образцов ПК каждого уровня «с гашением» демонстрировали значения относительного ингибирования, превышающие подтверждающий предел исключения.

Определение прецизионности между аналитическими сериями

Прецизионность методики между аналитическими сериями оценивали на основании анализа образцов НК и ПК (НПК, СПК и ВПК). Для оценки использовали результаты, полученные в ходе определения предела исключения: значения ОП и значения относительного ингибирования для образцов «с гашением» сигнала. Всего

⁶ <https://data.mendeley.com/datasets/fvfp4htspn/2>

⁷ Там же.

Таблица 2. Результаты оценки прецизионности внутри одной аналитической серии

Table 2. Validation results for within-run precision

Тип образца <i>Sample type</i>	ВПК <i>HPC</i>	СПК <i>MPC</i>	НПК <i>LPC</i>	НК <i>NC</i>
Без гашения / <i>Without competitive signal inhibition</i>				
Среднее значение ОП / <i>Mean OD</i>	0,755	0,406	0,091	0,046
Коэффициент вариации, % / <i>CV, %</i>	11,56	17,11	17,64	2,86
Всего образцов / <i>Total number of samples</i>	6	6	6	9
Положительных / <i>Positive</i>	6	6	6	0
С гашением / <i>With competitive signal inhibition</i>				
Среднее значение коэффициента ингибирования, % <i>Mean inhibition coefficient, %</i>	93,0	85,4	38,1	Не применимо <i>Not applicable</i>
Коэффициент вариации, % / <i>CV, %</i>	0,73	2,10	8,66	
Всего образцов / <i>Total number of samples</i>	3	3	3	
Положительных / <i>Positive</i>	3	3	3	

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

Примечание. НК – негативный контроль; ВПК – верхний положительный контроль; СПК – средний положительный контроль; НПК – нижний положительный контроль; ОП – оптическая плотность.

Note. NC, negative control; HPC, high positive control; MPC, medium positive control; LPC, low positive control; OD, optical density; CV, coefficient of variation.

Таблица 3. Результаты оценки прецизионности между аналитическими сериями

Table 3. Validation results for between-run precision

Тип образца <i>Sample type</i>	ВПК <i>HPC</i>	СПК <i>MPC</i>	НПК <i>LPC</i>	НК <i>NC</i>
Без гашения / <i>Without competitive signal inhibition</i>				
Среднее значение ОП / <i>Mean OD</i>	0,782	0,432	0,092	0,046
Коэффициент вариации, % / <i>CV, %</i>	17,65	17,15	13,37	3,43
Всего образцов / <i>Total number of samples</i>	36	36	36	9
Положительных / <i>Positive</i>	36	36	36	0
С гашением / <i>With competitive signal inhibition</i>				
Среднее значение коэффициента ингибирования, % <i>Mean inhibition coefficient, %</i>	94,09	88,89	47,03	Не применимо <i>Not applicable</i>
Коэффициент вариации, % / <i>CV, %</i>	0,84	2,14	7,23	
Всего образцов / <i>Total number of samples</i>	18	18	18	
Положительных / <i>Positive</i>	18	18	18	

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

Примечание. НК – негативный контроль; ВПК – верхний положительный контроль; СПК – средний положительный контроль; НПК – нижний положительный контроль; ОП – оптическая плотность.

Note. NC, negative control; HPC, high positive control; MPC, medium positive control; LPC, low positive control; OD, optical density; CV, coefficient of variation.

проанализировали 36 образцов ПК «без гашения» и 18 образцов «с гашением» в 6 аналитических сериях. Согласно полученным результатам, представленным в таблице 3, методика соответствовала критерию приемлемости, так как CV значений ОП между аналитическими сериями были <20% для каждого уровня образцов ПК.

Оценка «хук»-эффекта

Термин «хук»-эффект (от англ. hook effect, проагглютинационная зона) следует понимать как отсутствие повышения уровня детектируемого сигнала при увеличении концентрации аналита. Для проверки возможности ингибирования отклика образцов, содержащих избыток

АЛА к трастузумабу, проанализировали серию образцов, содержащих последовательные двукратные разведения АЛА с 640 до 0,16 нг/мл. Полученные значения ОП и интерпретированные результаты представлены в *таблице S4⁸* (дополнительная информация). Результаты проведенной оценки удовлетворяют критерию приемлемости, согласно которому отклик каждого полученного образца должен превышать величину скринингового предела исключения вплоть до уровня НОК.

Оценка стабильности методики

В ходе валидации методики оценивали краткосрочную и долгосрочную стабильность,

а также стабильность при замораживании-оттаивании. Для оценки краткосрочной стабильности проанализировали три образца ПК (НПК, СПК и ВПК), хранившиеся при комнатной температуре в течение 6 ч. Исследования проводили в составе аналитической серии, включающей образцы НК, бланковой матрицы для приготовления всех образцов ПК и свежеприготовленных образцов ПК как «без гашения», так и «с гашением». Для оценки долгосрочной стабильности исследовали три размороженных образца НПК, СПК и ВПК, хранившиеся при температуре минус 70 °С в течение 90 сут. После размораживания все образцы проанализировали в составе аналитической серии

Таблица 4. Результаты тестов на краткосрочную и долгосрочную стабильность, а также стабильность при замораживании-оттаивании

Table 4. Results of short-term, long-term and freeze-thaw stability tests

Образец <i>Sample</i>	Среднее значение ОП <i>Mean OD</i>	Коэффициент вариации, % <i>CV, %</i>	Среднее ингибирование, % <i>Mean inhibition, %</i>
Краткосрочная стабильность / <i>Short-term stability</i>			
НПК / <i>LPC</i>	0,12	0,003	69,24
ExНПК / <i>ExLPC</i>	0,047	0,001	
СПК / <i>MPC</i>	0,669	0,006	92,93
ExСПК / <i>ExMPC</i>	0,047	0,001	
ВПК / <i>HPC</i>	1,163	0,097	95,76
ExВПК / <i>ExHPC</i>	0,049	0,001	
Долгосрочная стабильность / <i>Long-term stability</i>			
НПК / <i>LPC</i>	0,149	0,003	96,88
ExНПК / <i>ExLPC</i>	0,049	0,0002	
СПК / <i>MPC</i>	0,856	0,039	66,98
ExСПК / <i>ExMPC</i>	0,049	0,0003	
ВПК / <i>HPC</i>	1,511	0,043	94,31
ExВПК / <i>ExHPC</i>	0,049	0,001	
Стабильность при замораживании-оттаивании / <i>Freeze-thaw stability</i>			
НПК / <i>LPC</i>	0,132	0,006	68,89
ExНПК / <i>ExLPC</i>	0,049	0,002	
СПК / <i>MPC</i>	0,76	0,081	93,16
ExСПК / <i>ExMPC</i>	0,048	0,001	
ВПК / <i>HPC</i>	1,231	0,037	96,01
ExВПК / <i>ExHPC</i>	0,049	0,001	

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

Примечание. Ex – обозначение образца «с гашением»; НК – негативный контроль; ВПК – верхний положительный контроль; СПК – средний положительный контроль; НПК – нижний положительный контроль; ОП – оптическая плотность.

Note. Ex, samples with an excess of trastuzumab for competitive signal inhibition; NC, negative control; HPC, high positive control; MPC, medium positive control; LPC, low positive control; OD, optical density; CV, coefficient of variation.

⁸ <https://data.mendeley.com/datasets/fvfp4htspn/2>

со свежеприготовленными аналогичными образцами, образцами НК и бланковой матрицы как «без гашения», так и «с гашением».

Аналогичные условия измерений и состав аналитической серии использовали для оценки стабильности при замораживании-оттаивании. Экспериментальные образцы подвергали трехкратному циклу замораживания-оттаивания до минус 70 °С и хранению в течение 12 ч. Во всех случаях рассчитывали PSCP и подтверждали

пригодность аналитических циклов. Результаты экспериментов по оценке стабильности представлены в *таблице 4*.

Во всех случаях исследованные образцы признаны стабильными, так как средний отклик образцов ПК (НПК, СПК и ВПК) превышал величину скринингового предела исключения как минимум на 66,7% для каждого уровня, а значения CV между повторностями при анализе всех уровней образцов ПК были

Таблица 5. Результаты исследования стабильности (хранение образцов при минус 70 °С и 3 цикла замораживания-оттаивания)

Table 5. Stability study results (storage at –70 °C and three freeze–thaw cycles)

Образец <i>Sample</i>	Среднее значение ОП <i>Mean OD</i>	Ингибирование, % <i>Inhibition, %</i>	Сравнение с SCP <i>Compared with SCP</i>	Сравнение с CCP <i>Compared with CCP</i>
FT70 LPC	0,1339	64,68	POS	POS
FT70 ExLPC	0,0473		NEG	
FT70 MPC	0,7025	93,30	POS	POS
FT70 ExMPC	0,0471		NEG	
FT70 HPC	1,2411	96,00	POS	POS
FT70 ExHPC	0,0496		NEG	
FT70 LPC	0,1257	60,06	POS	POS
FT70 ExLPC	0,0502		NEG	
FT70 MPC	EXL	92,10	EXL	EXL
FT70 ExMPC	0,0495		NEG	
FT70 HPC	1,2615	96,13	POS	POS
FT70 ExHPC	0,0488		NEG	
FT70 LPC	0,1372	63,92	POS	POS
FT70 ExLPC	0,0495		NEG	
FT70 MPC	0,8171	94,09	POS	POS
FT70 ExMPC	0,0483		NEG	
FT70 HPC	1,1904	95,90	POS	POS
FT70 ExHPC	0,0488		NEG	
Всего образцов <i>Total number of samples</i>	НПК / <i>LPC</i>	3	Из них пригодны <i>Number of acceptable samples</i>	3
	СПК / <i>MPC</i>	3		2
	ВПК / <i>HPC</i>	3		3

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

Примечание. POS – образец признан положительным при сравнении с данным пределом исключения; NEG – образец признан отрицательным при сравнении с данным пределом исключения; EXL – образец не соответствует критерию приемлемости по вариабельности между повторностями; FT70 – образец для исследования стабильности при замораживании-оттаивании; НПК – нижний положительный контроль; СПК – средний положительный контроль; ВПК – верхний положительный контроль; Ex – обозначение образца «с гашением»; ОП – оптическая плотность; SCP – фиксированный предел исключения; CCP – предел исключения подтверждающего метода.

Note. POS, positive sample relative to the above exclusion limit; NEG, negative sample relative to the above exclusion limit; EXL, sample non-compliant with the acceptance criterion for variability between replicates; FT70, freeze–thaw stability sample; LPC, low positive control; MPC, medium positive control; HPC, high positive control; Ex, sample with an excess of trastuzumab for competitive signal inhibition; OD, optical density; SCP, screening cut point; CCP, confirmatory cut point.

<20% (критерий приемлемости). Лишь в одном измерении из девяти (СПК при замораживании-оттаивании, 11,1%) образец не соответствовал критерию приемлемости по вариабельности между повторностями (табл. 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования валидирована методика полуколичественного определения антилекарственных антител

к трастузумабу в образцах сыворотки крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Полученные валидационные параметры представленной тест-системы свидетельствуют в пользу ее практической применимости для оценки наличия антилекарственных антител к трастузумабу в образцах сыворотки крови пациентов, получающих таргетные препараты в сочетании с химиотерапией.

Литература/References

- Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet*. 2017;389(10074):1134–50. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)31891-8)
- Xiao Y, Ding J, Ma D, Chen S, Li X, Yu K. Predicting pathological complete response in neoadjuvant dual blockade with trastuzumab and pertuzumab in HER2 gene amplified breast cancer. *Front Immunol*. 2022;13:877825. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.877825>
- Schlam I, Tarantino P, Tolanev SM. Overcoming resistance to HER2-directed therapies in breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(16):3996. <https://doi.org/10.3390/cancers14163996>
- Pernas S, Tolanev SM. HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance. *Ther Adv Med Oncol*. 2019;11:1758835919833519. <https://doi.org/10.1177/1758835919833519>
- Pereira N, Chan K, Lin P, Song Z. The “less-is-more” in therapeutic antibodies: Afucosylated anti-cancer antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *MAbs*. 2018;10(5):693–711. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1466767>
- Nader-Marta G, Martins-Branco D, de Azambuja E. How we treat patients with metastatic HER2-positive breast cancer. *ESMO Open*. 2022;7(1):100343. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100343>
- Derakhshani A, Rezaei Z, Safarpour H, Sabri M, Mir A, Sanati M, et al. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy. *J Cell Physiol*. 2020;235(4):3142–56. <https://doi.org/10.1002/jcp.29216>
- Baert F, Noman M, Vermeire S, Van Assche G, D’Haens G, Carbonez A, Rutgeerts P. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn’s disease. *N Engl J Med*. 2003;348(7):601–8. <https://doi.org/10.1056/nejmoa020888>
- Bartelds G, Kriekkaert C, Nurmohamed M, van Schouwenburg P, Lems W, Twisk J, et al. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA*. 2011;305(14):1460–8. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.406>
- van Schouwenburg P, van de Stadt L, de Jong R, van Buren E, Kruihof S, de Groot E, et al. Adalimumab elicits a restricted anti-idiotypic antibody response in autoimmune patients resulting in functional neutralisation. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(1):104–9. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201445>
- Kierzek A, Hickling T, Figueroa I, Kalvass J, Nijssen M, Mohan K, et al. A quantitative systems pharmacology consortium approach to managing immunogenicity of therapeutic proteins. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2019;8(11):773–6. <https://doi.org/10.1002/psp4.12465>
- Pohlmann P, Miller T, Blum D, Parih D, Yan H, Sutton C, et al. Trastuzumab-reactive antibodies in serum and trastuzumab benefit prediction in patients with HER2-overexpressing breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(30 suppl):77. https://doi.org/10.1200/jco.2012.30.30_suppl.77
- Padrón I, García J, Díaz R, Lenza I, Nicolás F. Anti-drug antibodies anti-trastuzumab in the treatment of breast cancer. *J Oncol Pharm Pract*. 2021;27(6):1354–6. <https://doi.org/10.1177/1078155220953873>
- Pivot X, Bondarenko I, Nowecki Z, Dvorkin M, Trishkina E, Ahn J, et al. A phase III study comparing SB3 (a proposed trastuzumab biosimilar) and trastuzumab reference product in HER2-positive early breast cancer treated with neoadjuvant-adjuvant treatment: final safety, immunogenicity and survival results. *Eur J Cancer*. 2018;93:19–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.01.072>
- Kilany L, Gaber A, Aboulwafa M, Zedan H. Trastuzumab immunogenicity development in patients’ sera and in laboratory animals. *BMC Immunol*. 2021;22(1):15. <https://doi.org/10.1186/s12865-021-00405-z>
- Nath N, Godat B, Flemming R, Urh M. Bioluminescent bridging immunoassay for anti-drug antibody (ADA) detection. *Methods Mol Biol*. 2022;2313:313–22. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1450-1_20
- Елисеева ОА, Колганова МА, Шохин ИЕ, Дементьев СП, Власов АМ, Замятнин АА и др. Разработка и валидация методики определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):120–7. Eliseeva OA, Kolganova MA, Shokhin IE, Demytyev SP, Vlasov AM, Zamyatnin AA, et al. Development and validation of the ELISA method for anti-trastuzumab antibodies determination in human serum. *Drug Development & Registration*. 2022;11(4):120–7 (In Russ.). [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-120-127](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-120-127)
- Писарев ВВ, Иванов АВ. Валидация тест-системы для количественного определения концентрации трастузумаба (Герцептин, Гертикад) в биологических жидкостях методом твердофазного иммуноферментного анализа. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(1):58–64. Pisarev VV, Ivanov AV. Validation of ELISA test-system for trastuzumab (Herceptin, Hertikad) quantitative determination in biological fluids. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2023;(1):58–64 (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-58-64>
- Myler H, Pedras-Vasconcelos J, Phillips K, Hottenstein CS, Chamberlain P, Devanaryan V, et al. Anti-drug antibody validation testing and reporting harmonization. *AAPS J*. 2021;24(1):4. <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00649-y>
- Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett Y, Bowsher R, Finco-Kent D, et al. Recommendations

for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products.

J Pharm Biomed Anal. 2008;48(5):1267–81.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.09.020>

Дополнительная информация. Дополнительные материалы к статье размещены в репозитории Mendeley Data и доступны по ссылке

<https://data.mendeley.com/datasets/fvfp4htspn/2>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **В.В. Писарев** – разработка концепции исследования, проведение экспериментов и общее руководство; **А.В. Иванов** – обработка данных и написание текста рукописи.

Additional information. Supplementary materials for this article are available in the Mendeley Data repository and can be accessed at

<https://data.mendeley.com/datasets/fvfp4htspn/2>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **V.V. Pisarev** conceptualised the study, conducted the experiments, and provided general supervision. **A.V. Ivanov** processed the data and drafted the manuscript.

Об авторах / Authors

Писарев Владимир Викторович, канд. хим. наук / **Vladimir V. Pisarev**, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3212-4369>

Иванов Андрей Владимирович, канд. биол. наук / **Andrei V. Ivanov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1676-7754>

Поступила 13.11.2023

После доработки 22.09.2024

Принята к публикации 03.03.2025

Online first 06.03.2025

Received 13 November 2023

Revised 22 September 2024

Accepted 3 March 2025

Online first 6 March 2025



Услуги ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



ФАРМАКОПЕЙНЫЕ СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ



ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ



ВВОД В ГРАЖДАНСКИЙ ОБОРОТ



ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ МЕРОПРИЯТИЯ



ЭКСПЕРТНАЯ НАУЧНАЯ ПОМОЩЬ



МЕЖЛАБОРАТОРНЫЕ СЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ



ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ РАСЧЕТ ОБРАЗЦОВ



ТРАНСФЕР МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ



ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

Приглашаем к сотрудничеству всех заинтересованных представителей фармацевтического сообщества



ISSN 2221-996X



9 772221 996004