

БИОПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Том 16, № **4** (60)
Октябрь – декабрь 2016



ISSN 2221-996X



9 772221 996004

Первые биоподобные лекарственные препараты моноклональных антител

Исследование кросс-реактивности терапевтических препаратов на основе моноклональных антител на тканях человека:

основные подходы и методические приемы

Определение остаточной ДНК клеток-продуцентов *E. coli* и CHO

в субстанциях рекомбинантных белков методом qPCR



Л. А. Тарасевич

Учредитель

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Издатель

Издательский дом «Фолиум»

Главный редактор

Олефир Ю. В.

Заместители**главного редактора**

Меркулов В. А.

Бондарев В. П.

Ответственный секретарь

Климов В. И.

Научный редактор

Лебединская Е. В.

Члены редколлегии

Авдеева Ж. И.

Балаболкин И. И.

Борисевич И. В.

Воробьева М. С.

Гущин И. С.

Дармов И. В.

Иванов В. Б.

Игнатьев Г. М.

Леви Д. Т.

Медуницын Н. В.

Мовсесянц А. А.

Мосягин В. Д.

Таточенко В. К.

Ткаченко Е. А.

Хамитов Р. А.

Редакционный совет

Амвросьева Т. В. (Беларусь)

Борисевич С. В. (Сергиев Посад)

Брико Н. И. (Москва)

Волчков В. Е. (Франция)

Гинцбург А. Л. (Москва)

Дятлов И. А. (Оболensk)

Зверев В. В. (Москва)

Кутырев В. В. (Саратов)

Львов Д. К. (Москва)

Михайлов М. И. (Москва)

Покровский В. И. (Москва)

Савченко В. Г. (Москва)

Учайкин В. Ф. (Москва)

Хаитов Р. М. (Москва)

Чумаков К. М. (США)

СОДЕРЖАНИЕ**Обзоры****Персональный и коллективный иммунитет при вакцинации**

Н. В. Медуницын, Ю. В. Олефир, В. А. Меркулов, В. П. Бондарев 195

Первые биоподобные лекарственные препараты моноклональных антител

Ж. И. Авдеева, А. А. Солдатов, Н. А. Аллатова, В. П. Бондарев, Ю. В. Олефир, В. А. Меркулов, В. Д. Мосягин, Н. В. Медуницын 208

Новые антирабические рекомбинантные вакцины

Е. С. Седова, М. М. Шмаров 219

Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств

Р. А. Волкова, О. В. Фадейкина, В. И. Климов, Е. И. Саканян, Ю. В. Олефир, В. А. Меркулов, А. А. Мовсесянц, В. П. Бондарев, И. В. Борисевич, Д. В. Шведов 229

Оригинальные статьи**Исследование кросс-реактивности терапевтических препаратов на основе моноклональных антител на тканях человека: основные подходы и методические приемы**

Т. Ю. Остроухова, В. А. Иванов, Е. Л. Морозова, Р. А. Иванов 237

Определение остаточной ДНК клеток-продуцентов *E. coli* и СНО в субстанциях рекомбинантных белков методом qPCR

Н. Д. Ёлшин 245

Оценка качества вакцины туляреминой живой по результатам испытаний в рамках обязательной сертификации

И. В. Касина, Л. И. Рашепкин, А. А. Горяев, С. А. Алексеева, Т. И. Немировская, А. А. Мовсесянц 253

Разработка и аттестация отраслевого стандартного образца для оценки подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной

М. В. Абрамцева, Т. И. Немировская, О. Б. Устинникова, О. В. Фадейкина, Р. А. Волкова, А. А. Мовсесянц 260

Хроника

Николай Васильевич Медуницын (к 85-летию со дня рождения) 264

Андрей Рудольфович Волгин (к 55-летию со дня рождения) 266

Адрес редакции:

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.

Тел.: +7 495 234-61-04, +7 495 214-91-19 (доб. 63-35; 63-36). E-mail: biopreparaty@expmed.ru.

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-53128 от 14 марта 2013 г.

Все права защищены. Любое воспроизведение опубликованных материалов без письменного согласия редакции не допускается. При перепечатке ссылка на журнал обязательна.

Журнал включен в наукометрическую базу данных Science Index.

Подписано в печать 21.11.2016.

Подписной индекс **25120**

в каталоге «Газеты. Журналы» агентства «Роспечать».

Выходит один раз в три месяца.

Дизайн, верстка, печать: Издательский дом «Фолиум»





L. A. Tarasevich

Founder

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

Publisher

Folium Publishing Company

Editor-in-Chief

Olefir Yu. V.

Deputy Editor-in-Chief

Merkulov V. A.

Bondarev V. P.

Executive Secretary

Klimov V. I.

Science Editor

Lebedinskaya E. V.

Editorial Board

Avdeeva Zh. I.

Balabolkin I. I.

Borisevich I. V.

Darmov I. V.

Gouschin I. S.

Ivanov V. B.

Ignatiev G. M.

Khamitov R. A.

Levi D. T.

Medunitsyn N. V.

Movsesyants A. A.

Mosyagin V. D.

Tatochenko V. K.

Tkachenko E. A.

Vorobieva M. S.

Editorial Council

Amvrosieva T. V. (Belarus)

Borisevich S. V. (Sergiev Posad)

Briko N. I. (Moscow)

Volchkov V. E. (France)

Gintsburg A. L. (Moscow)

Dyatlov I. A. (Obolensk)

Zverev V. V. (Moscow)

Kutyrev V. V. (Saratov)

Lvov D. K. (Moscow)

Mikhailov M. I. (Moscow)

Pokrovskiy V. I. (Moscow)

Savchenko V. G. (Moscow)

Uchaikin V. F. (Moscow)

Khaitov R. M. (Moscow)

Chumakov K. M. (USA)

CONTENTS

Reviews

- Vaccination contribute to the development of personal and herd immunity**
N. V. Medunitsyn, Yu. V. Olefir, V. A. Merkulov, V. P. Bondarev 195
- First available biosimilar monoclonal antibodies**
Zh. I. Avdeeva, A. A. Soldatov, N. A. Alpatova, V. P. Bondarev, Yu. V. Olefir,
V. A. Merkulov, V. D. Mosyagin, N. V. Medunitsyn 208
- New recombinant rabies vaccine**
E. S. Sedova, M. M. Shmarov 219
- Topical issues related to reference standards in the sphere of circulation
of biological products**
R. A. Volkova, O. V. Fadeikina, V. I. Klimov, E. I. Sakanyan, Yu. V. Olefir,
V. A. Merkulov, A. A. Movsesyants, V. P. Bondarev, I. V. Borisevich, D. V. Shvedov 229

Original Articles

- The study of cross-reactivity of therapeutic drugs based on monoclonal antibodies
on human tissues: basic approaches and methodological techniques**
T. Y. Ostroukhova, V. A. Ivanov, E. L. Morozova, R. A. Ivanov 237
- Detection of residual *E. coli* and CHO host-cell DNA in recombinant proteins by qPCR**
N. D. Yolshin 245
- Live tularemia vaccine quality assessment according to test results
under the mandatory certification**
I. V. Kasina, L. I. Raschepkin, A. A. Goryaev, S. A. Alekseeva, T. I. Nemirovskaya,
A. A. Movsesyants 253
- The development and certification of the industrial reference standard
for identification of meningococcal polysaccharide vaccine group A**
M. V. Abramtseva, T. I. Nemirovskaya, O. B. Ustinnikova, O. V. Fadeykina,
R. A. Volkova, A. A. Movsesyants 260

Chronicle

- Nikolay Vasilievich Medunitsyn (on the 85th anniversary)** 264
- Andrey Rudol'fovich Volgin (on the 55th anniversary)** 266

Address of the Editorial Office:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal
Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2,
Moscow, 127051, Russian Federation. Tel.: +7 495 234-61-04, +7 495 214-91-19 (ext. 63-35; 63-36).
E-mail: biopreparaty@expmed.ru.

Publication is registered by the Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom,
Information Technologies and Mass Communications. Certification of the Mass Media
Registration PI No. ФС77-53128 of March 14, 2013.

All rights reserved. No part of this publication may be used or reproduced
in any form or by any means without the prior written permission of the Publishers.
Reproducing any part of this material a reference to the journal is obligatory.

The publication data for the journal is 21.11.2016.

Publication is once every 3 months.

CRC preparation and printing: Folium Publishing Company.



Персональный и коллективный иммунитет при вакцинации

Н. В. Медуницын, Ю. В. Олефир, В. А. Меркулов, В. П. Бондарев

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 12.09.2016 г. Принята к публикации 17.11.2016 г.

Приведены доказательства необходимости персонализации вакцинации и примеры из практики, свидетельствующие о возможности такого подхода. Для проведения персонализации вакцинации необходимы предварительное определение титров антител (или кожных проб замедленного типа) и последующая коррекция развития иммунитета у лиц с низкими титрами защитных антител или с признаками гипериммунизации. Описаны преимущества персонализации вакцинации и перечислены мероприятия, которые следует провести для достижения этой цели. Указаны трудности такой персонализации и способы их преодоления. Персонализация вакцинации не требует больших финансовых затрат и способствует развитию вакцинопрофилактики. Персонализация вакцинации необходима для скорейшего достижения коллективного иммунитета, при котором происходит снижение заболеваемости данной инфекцией и, как правило, сокращение циркуляции ее возбудителя. Решающим условием формирования коллективного иммунитета является появление «иммунной прослойки», которая состоит преимущественно из переболевших и вакцинированных лиц, а также лиц, иммунизированных естественным путем циркулирующим в среде возбудителем инфекции. Эффективность коллективного иммунитета снижается при генетической изменчивости возбудителя, частых отводов и отказов от вакцинации. Длительное сохранение коллективного иммунитета обеспечивает иммунологическая память.

Ключевые слова: вакцины; вакцинация; дифференцированный подход; коррекция иммунитета; защитные титры антител; индивидуализация (персонализация) вакцинации.

Библиографическое описание: Медуницын НВ, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Персональный и коллективный иммунитет при вакцинации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16 (4): 195–207.

Одним из наиболее эффективных методов предупреждения инфекционных болезней является вакцинация, с помощью которой во всем мире сделаны большие успехи. В России по сравнению с допрививочным периодом заболеваемость инфекциями календаря прививок снизилась в десятки и сотни раз (табл. 1).

ВОЗ считает, что настоящий век является веком вакцинации (иммунизации). Однако возможности вакцинации далеко не исчерпаны. В настоящее время 19,3 млн детей остаются невакцинированными. Они входят в группу риска заболеть инфекционными болезнями, против которых есть вакцины [1].

Существует представление, что со временем (с годами) иммунологическая активность населения падает. Предполагаемыми причинами снижения иммунологической активности населения могут быть:

- уменьшение числа эпидемий и вспышек инфекций;
- сокращение циркуляции микрофлоры;
- уменьшение количества лиц, способных отвечать сильной иммунной реакцией на антигены;
- широкое применение дезсредств, антибиотиков и других антимикробных препаратов;
- использование стерильной и рафинированной пищи;
- действие других неблагоприятных факторов внутренней и внешней среды.

В соответствии с календарем прививок широкую вакцинацию детей проводят с первых дней их жизни, несмотря на то, что в это время иммунная система ребенка недостаточно развита.

Причины слабости иммунного ответа у новорожденных детей:

- недоразвитие лимфоидной ткани;

- недостаточное образование цитокинов (γ -интерферона и других медиаторов иммунного ответа);
- слабая функция макрофагов, дендритных клеток и клеток-хелперов;
- присутствие у новорожденных детей материнских антител, которые поступают в плод через плаценту и тормозят образование собственных антител у реципиента.

В течение первого полугодия жизни ребенок плохо отвечает на вакцины, например, на Т-независимые полисахаридные вакцины. Лишь конъюгирование полисахарида с белковым носителем (например, микробным анатоксином) придает вакцине хорошую иммуногенность.

Содержание антител у детей в годовалом возрасте составляет всего 60 % от уровня антител взрослого, уро-

Таблица 1. Эффективность вакцинации

Наименование инфекции	Заболевание на 100 тыс. населения		Снижение заболеваемости
	до прививок	по состоянию на 2014 год	
Корь	800–1000	1,6	500 раз
Эпидемический паротит	300–500	0,2	150 раз
Коклюш	100–200	3,15	40 раз
Дифтерия	50–90	2,0	200 раз
Полиомиелит	10	0	Случаев заболевания нет
Гепатит В	30–40	1,3	10 раз
Краснуха	120–400	0,16	100 раз

вень IgG — 80 %, а количество IgA, столь важного для секреторного иммунитета, — всего лишь 20 % от концентрации иммуноглобулина взрослого человека.

У детей после рождения наблюдаются пять критических периодов, связанных, прежде всего, с недостаточной функцией иммунной системы. В течение первых двух периодов (до полугода), когда наблюдается низкое содержание лимфоцитов и исчезают материнские антитела, ребенку вводят БЦЖ и по три дозы вакцин против полиомиелита, гепатита В, коклюша, дифтерии, столбняка и гемофильной инфекции. В последующие три периода (до 15 лет) также происходят различного рода возрастные изменения, и появляется повышенный риск возникновения воспалительных, аллергических и аутоиммунных болезней, тесным образом связанных с недостаточной функцией иммунной системы.

Все это свидетельствует о необходимости более внимательного отношения к вакцинации детей раннего возраста.

Известно, что вакцины по своим свойствам отличаются от фармацевтических препаратов. Для производства вакцин необходимы особые условия. Вакцины имеют сложный состав, сложный механизм действия, обладают способностью вызывать нежелательные реакции и осложнения. Страна располагает основными видами вакцин против 50 инфекций. По основным показателям безопасности и эффективности отечественные вакцины соответствуют требованиям ВОЗ.

В России зарегистрировано более 100 вакцин, из них чуть меньше половины составляют вакцины зарубежного производства. Некоторых вакцин, которые выпускаются за рубежом, у нас нет [2]. Разрабатываются вакцины против особо опасных инфекционных заболеваний [3]. Бесклеточная коклюшная вакцина проходит клинические исследования.

Нет производства вакцин против:

- вируса папилломы человека;
- ветряной оспы;
- пневмококковой инфекции;
- ротавирусной диарейной инфекции.

Основой современной медицины является дифференцированный подход к лечению и профилактике разных заболеваний человека. Несмотря на общий характер развития иммунитета на чужеродные антигены, в том числе на прививку, иммунный ответ у каждого человека всегда индивидуален. Лица, плохо реагирующие на одну вакцину, могут хорошо отвечать на другую. Это связано с генетическими особенностями людей. Существует тесная связь между чувствительностью человека к отдельным видам инфекций, интенсивностью возникающего иммунитета и наличием или отсутствием у него определенных антигенов главного комплекса гистосовместимости, которые контролируются генами, расположенными в локусах А, В и С класса I и локусах DR, DQ и DP класса II HLA системы человека.

Механизмы действия продуктов генов ГКГ, присутствие которых увеличивает риск возникновения заболевания, остаются слабо изученными [4–8]. Восприимчивость к инфекциям связана с присутствием на клетках специальных рецепторов для патогенов, вызывающих эти инфекции. Например, существует линия мышей восприимчивых к заражению вирусом полиомиелита. Мыши получены путем введения в их геном гена, кодирующего клеточный рецептор к вирусу полиомиелита [9, 10]. Таким образом,

без специальных клеточных рецепторов инфекционный процесс не развивается.

Существование обратной ассоциации, когда высокий уровень отдельных продуктов генов сочетается с высокой степенью устойчивости к инфекционному агенту [11–14] объясняется тем, что эти трансплантационные антигены являются продуктами Ir-генов (генов иммунного ответа), от которых зависит сила иммунного ответа на конкретные внешние и внутренние антигены.

I. Персональный иммунитет

Люди неодинаково реагируют на одну и ту же вакцину. Более того, каждый человек по-разному реагирует на разные вакцины, на одну из них он может реагировать слабо, на другую — сильно. Календарь прививок, жесткие правила и инструкции по вакцинации составлены для «усредненных» по иммунологической активности людей. Врач не имеет права менять эти правила, любые отступления ведут к юридической ответственности в случае возникновения каких-либо побочных явлений после введения вакцины.

Дифференцированный подход применяется при вакцинации отдельных групп лиц повышенного риска [15–17], среди них:

- медицинские работники, персонал общепита;
- контингенты домов престарелых, домов ребенка, интернатов;
- беременные, новорожденные;
- лица, выезжающие за рубеж в эндемичные регионы, беженцы.

К группам детей особого повышенного риска, к которым в первую очередь необходимо применять дифференцированный метод, относятся:

- недоношенные и ослабленные дети;
- дети с иммунодефицитами;
- дети, больные острыми и хроническими заболеваниями.

В арсенал существующих средств, которые могут быть использованы для дифференцированной вакцинации, входят:

- одноименные вакцины с разной степенью реактогенности и иммуногенности (живые, инактивированные, расщепленные, субъединичные вакцины) [3, 18, 19];
- вакцины с уменьшенным содержанием анатоксина (АДС-М, АД-М-вакцины для плановой возрастной иммунизации) или с уменьшенным количеством бактериальных клеток (БЦЖ-М-вакцина для вакцинации недоношенных и ослабленных детей);
- разные дозы одной и той же вакцины, выпускаемые для иммунизации взрослых и детей (вакцины против гепатитов А и В, гриппа, клещевого энцефалита и др.);
- вакцины с разными адъювантами и разными консервантами;
- обычные и ускоренные схемы иммунизации против некоторых инфекций, например, против гепатита В.

На этом селективные методы вакцинации кончаются. Нет ни индивидуального подхода, ни тем более индивидуальных вакцин. В свое время исследователи увлекались аутовакцинами для лечения хронических инфекционных болезней. Вакцины готовили из тех микроорганизмов, которые были выделены у конкретных пациентов [20]. Принцип замечательный и истинно индивидуальный, но метод не вошел в практику из-за технических трудностей и невозможности организовать независимый контроль таких индивидуальных вакцин.

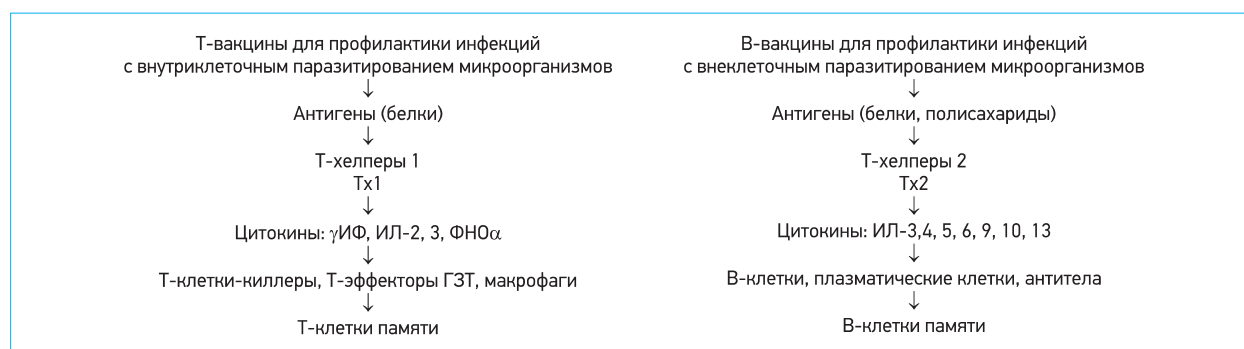


Рис. 1. Т- и В-вакцины.

Трудность в коррекции иммунитета заключается в существовании двух типов иммунитета: гуморального и клеточного. На основании этого различают Т- и В-вакцины (рис. 1). У таких вакцин все разное: антигены, разные Т-хелперы, разный набор цитокинов, разные эффекторские клетки и даже разные клетки памяти. Это учитывается при разработке новых вакцин, вакцин со сложной конструкцией, включающей разные антигены и цитокины, ответственные за разные типы иммунного ответа.

Любой крупномолекулярный антиген, используемый для приготовления вакцины, содержит несколько детерминантных групп. Каждая из них вызывает свой иммунный ответ. Иммунологическая реакция на вакцину является, по существу, суммой ответов на пептиды, поэтому различия между группами, сильно и слабо реагирующими на вакцину, сглажены. Еще более сложная мозаика иммунных ответов возникает при введении комплексных вакцин, направленных на профилактику нескольких инфекций. В этом случае большинство вакцинируемых хорошо реагируют одновременно на несколько компонентов сложных комбинированных вакцин, однако всегда можно выделить группы людей, отвечающих слабо или сильно на 1–2 или несколько видов моновакцин, входящих в состав препарата [21].

Из двух типов иммунитета наиболее изучен гуморальный иммунный ответ. Для многих управляемых инфекций, при которых он развивается, установлен так называемый защитный титр антител (табл. 2). Это понятие относительное, потому что защита может проявляться, если титр антител ниже защитного, а присутствие антител еще не является полной гарантией защиты. Например, защитный титр при вакцинации против гриппа — 1:40 по реакции гемагглютинации. В контролируемых исследованиях показано, что риск заболеть гриппом исчезает только при более высоком титре антител — 1:100, т.е. в 2,5 раза превышающем защитный титр. Вероятно, это характерно не только для гриппа, но и для других инфекций. Некоторое количество лиц, которые имеют так называемый защитный титр антител, на самом деле могут быть недостаточно защищены от инфекций.

Для большинства инфекций, защита против которых обусловлена клеточными факторами иммунитета (туберкулез, туляремия, бруцеллез и др.), «защитные титры» клеточных реакций после вакцинации не установлены.

Изучено распределение численности лиц с разным уровнем антител к компонентам комбинированной вакцины против кори, паротита и краснухи [22]. Вакцинированные дети были разделены на 3 группы в соответствии с тремя видами моновакцин, входящих в состав комбинированной вакцины (табл. 3). Для каждой группы подбирали

детей с низкими и высокими титрами антител (для вируса кори — три группы). При анализе всех данных можно сделать общий вывод: у одних и тех же детей уровни антител к трем видам вакцин изменяются синхронно. Одни и те же дети, имеющие высокие титры антител к вирусу паротита, также хорошо реагируют на вакцины против краснухи и кори. Конечно, нет прямой корреляции, это лишь общая закономерность.

В таблице 4 представлены результаты испытаний 4 новых гепатитных вакцин разных предприятий на 1120 взрослых лицах. У каждой вакцины был свой препарат сравнения. Испытания проведены с препаратами разных фирм и в разное время. Анализ данных всех групп вакцинированных показал, что после вакцинации по схеме 0–1–2 мес. антитела отсутствовали примерно у 8 % лиц, высокий уровень антител зарегистрирован у 39 % и очень высокий (более 1000 мМЕ) — у 16,4 %. Таким образом, после вакцинации образуются группы лиц с очень сильным и очень слабым иммунным ответом на вакцины, хотя основная масса людей занимает среднее положение [23–25].

Сохраняется ли со временем, с возрастом вакцинированных такое соотношение численности лиц с разными уровнями титров антител? При определении уровня антител к гепатиту В у медицинских работников через 1 мес. и через 5 лет после трехразовой вакцинации показано (табл. 5), что соотношение групп с разным уровнем антител меняется слабо, т.е. группы лиц с низким, средним и высоким уровнем антител сохраняются, отношение лишь

Таблица 2. Защитные титры антител

Инфекция	Титры антител после вакцинации		Методы определения антител
	Защитные титры	Высокие титры	
Грипп	1:40	≥1:2560	РТГА
Дифтерия	1:40	≥1:640	РПГА
Столбняк	1:20	≥1:320	РПГА
Коклюш	1:160	≥1:2560	РА
Корь	1:10	≥1:80	РНГА
	1:4	≥1:64	РТГА
Краснуха	1:20	≥1:320	РТГА
Паротит	1:10	≥1:80	РПГА
Полиомиелит	1:8	≥1:256	РТГА
Гепатит В	5–10 мМЕ/мл	≥1000 мМЕ/мл	ИФА
Клещевой энцефалит	1:20	≥1:60	РТГА

Таблица 3. Титры антител у 35 лиц, привитых тривакциной Приорикс (Бельгия) для профилактики кори, паротита и краснухи

Методы определения антител	Распределение привитых по группам в зависимости от уровня антител		Средние и средние геометрические значений титров антител в величинах, обратных разведению сыворотки крови привитых		
	Число привитых	Титры антител	Вирус паротита	Вирус краснухи	Вирус кори
ИФА Вирус паротита	19	0–200	158 2,10±0,19	1058 2,84±0,20	68 1,80±0,10
	16	400–1600	675 2±0,12	1566 2,96±0,19	84 1,86±0,12
ИФА Вирус краснухи	13	100–400	308 2±0,29	330 2,49±0,12	58 1,73±0,12
	22	800–3200	445 2,46±0,21	1600 3,13±0,11	86 1,87±0,10
РТГА Вирус кори	5	16–32	280 2,42±9,19	1240 2,90±0,55	29 1,44±0,15
	23	64	304 2,36±0,18	1022 2,85±0,18	64 1,81±0
	7	128–256	742 2,54±0,69	1371 3,03±0,21	146 2,15±0,10

Таблица 4. Результаты испытаний вакцин против гепатита В

Вакцины	Соотношение групп привитых (процент) в зависимости от титров антител (мМЕ/мл)					Количество привитых
	Нет антител	Невысокий уровень (10–50)	Средний уровень (51–100)	Высокий уровень (101–1000)	Очень высокий уровень (>1000)	
Биовак	12,5	20,4	21,6	26,2	19,3	176
Энджерикс	10,4	11,8	19,3	31,1	27,4	195
Шанвак	—	4,1	4,1	67,5	24,3	74
Энджерикс	8,1	22,6	8,1	48,3	12,9	62
Регевак	4,8	23,0	21,5	32,3	18,3	223
Вирион	6,1	18,4	15,9	44,0	15,5	205
Р-ДНК	18,2	34,3	7,1	34,3	6,1	99
Энджерикс	17,4	38,4	8,1	31,4	4,7	86
Средний показатель	8,3	21,3	15,0	39,0	16,4	Всего 1120

сглаживается, несмотря на достаточно большой срок после вакцинации [26].

Таким образом, при вакцинации всегда можно выделить две крайние группы. Одна из них — лица, у которых антитела отсутствуют или не достигают защитного уровня. Это не защищает от инфекций и, вероятно, способствует развитию бактерио- и вирусоносительства. Даже при хорошо выполненной вакцинации людей в рамках календаря прививок значительное количество вакцинированных остается беззащитным (серонегативным).

Согласно Методическим указаниям МУ 3.1.2943–11 по организации и проведению серологического мониторин-

га, эта численность детей и взрослых по инфекциям календаря прививок составляет 5–10 %. Таким образом, при массовой вакцинации мы заранее закладываем достаточно большой процент лиц, которые будут лишены защиты после проведения вакцинации по существующим правилам.

Низкий уровень антител опасен еще с точки зрения возможности развития феномена антитело-зависимого усиления инфекции [27]. Суть феномена заключается в усилении инфекционного процесса в присутствии антител в низкой концентрации. Феномен подробно изучен на примере инактивированной коревой вакцины и инактивированной вакцины против респираторно-синцитиального вируса [28, 29]. Феномен появляется у болеющих лиц, имеющих низкий уровень антител, и у лиц, которым проводили неполноценную иммунизацию. В условиях *in vitro* можно наблюдать интенсивное размножение вирусов в клетках, культивируемых в среде с низким содержанием специфических антител. Происходит образование комплекса микроба с низкоаффинными антителами, фагоцитоз комплекса (с участием или без участия системы комплемента) и развитие инфекционного процесса. Феномен описан при разных вирусных и бактериальных заболеваниях (лихорадках Эбола, Марбург, денге, Ку, желтой ли-

Таблица 5. Соотношение численности вакцинированных с разным уровнем антител к вирусу гепатита В через 1 месяц и 5 лет после вакцинации

Уровень титров антител (мМЕ/мл)	Через 1 мес. (процент)	Через 5 лет (процент)
Низкий (<10)	8,3	13,5
Средний (11–100)	36,3	31,1
Высокий (101–1000)	39,0	36,5
Очень высокий (>1000)	16,4	18,9

хорадке, гепатите С, бешенстве, стафилококковой инфекции, туберкулезе и др.). Возможно, феномен является общим явлением для всех возбудителей инфекционных заболеваний. Этот же феномен наблюдается даже при введении иммуноглобулинов при применении по схеме лечения [30–34]. Установлено также, что феномен возникает на фоне инфекции или вакцинации, которые не обеспечивают достаточно высокий уровень антител. Антитела в низкой концентрации не могут подавить инфекцию, но связываются с возбудителем, способствуют его фиксации на клеточной поверхности и проникновению внутрь клетки.

В связи с постоянной циркуляцией возбудителей некоторых инфекций происходит естественная иммунизация людей до прививок. Часть из них могут иметь высокий исходный титр антител и они не нуждаются даже в первичной вакцинации. Другие лица могут давать очень высокие титры антител после вакцинации, и им, вероятно, не надо проводить ревакцинацию.

Гипериммунизация возникает чаще после повторной вакцинации, которая требуется в соответствии с инструкцией по применению для большинства вакцин календаря прививок. Лица с высоким уровнем предшествующих антител плохо реагируют на ревакцинацию. Например, среди лиц, имевших перед вакцинацией высокие титры противодифтерийных антител, у 12,9 % людей титры антител не изменялись после введения АДС-М-анатоксина, а у 5,6 % лиц титры антител падали ниже исходного уровня [35]. Таким образом, 18,5 % людей не нуждались в ревакцинации против дифтерии.

Иллюстрацией этого же являются данные по изменению уровня антител у 71 человека, которые были вакцинированы дивакциной против гепатитов А и В (табл. 6). У 1/3 части лиц после 3-й инъекции увеличения титров антител не отмечалось. У 15 вакцинированных титры антител против гепатита А остались без изменения, у 7 — титры уменьшились, а у 2 пациентов антитела даже исчезли. Аналогичные изменения отмечены у лиц, вакцинированных гепатитной В вакциной. Важно отметить, что титры уменьшались или антитела исчезали преимущественно у лиц, которые имели высокий уровень антител после 2-й инъекции вакцины. Таким образом, из 71 человека не следовало бы вакцинировать 3-й раз: 24 человека против гепатита А и 17 человек против гепатита В.

Спрашивается, выгодно ли с точки зрения целесообразности, экономичности и медицинской этики вакцинировать таких лиц 3-й раз, если уровень антител у них не повышался, а уменьшался, а в отдельных случаях антитела исчезали полностью?

Для сравнения следует отметить, что для профилактики и лечения гепатита В людям вводят только 1 мл иммунологического иммуноглобулина с активностью 100 МЕ/мл. При вакцинации концентрация иммуноглобулина бывает в 100 раз больше, чем при пассивной иммунизации. Такая высокая концентрация антител бывает также при искусственной иммунизации доноров с целью получения специфического Ig.

Таким образом, избыточная иммунизация является неоправданной, нецелесообразной с точки зрения медицинской этики, риска развития нежелательных реакций и осложнений и, что тоже немаловажно, с точки зрения финансовых затрат.

Повторное введение вакцины на фоне высоких титров антител:

- подавляет образование новых антител;

- препятствует приживлению живых микроорганизмов, входящих в состав живых вакцин;
- способствует образованию иммунных комплексов;
- усиливает побочное действие вакцин;
- не соответствует требованиям медицинской этики;
- увеличивает экономические затраты.

Многочисленные экспериментальные и клинические наблюдения свидетельствуют о необходимости индивидуализации (персонализации) вакцинации. Один из методов персонализации в медицине заключается в анализе полиморфизма генов, в поиске ассоциаций между наличием отдельных генов и способностью больных отвечать на различные лекарственные фармацевтические препараты. Если установлена зависимость лечебного эффекта от наличия того или иного гена или сочетания генов, это дает врачам мощное средство для направленного действия на отдельные звенья патологического процесса.

С помощью этого метода обнаружены различия в генетических ассоциациях у серопозитивных и серонегативных лиц, вакцинированных против кори, паротита, краснухи и гриппа [36], что, по мнению авторов, может быть основой для разработки групповых вакцин с учетом полиморфизма генов, контролирующего иммунный ответ у разных групп лиц. Метод имеет большое будущее, однако сейчас он позволяет судить об ассоциации только по принципу «есть связь—нет связи» без количественной оценки такой связи.

Эффективным методом персонализации является метод иммунологической коррекции вакцинации. Многочисленные данные свидетельствуют, что после вакцинации значительное число незащищенных лиц и лиц с очень высокими титрами антител нуждается в принятии мер по коррекции формирования у них иммунитета. Вакцину вводят, как правило, два и более раз. По динамике развития поствакцинального иммунитета после первичного или повторного введения вакцины можно составить прогноз дальнейшего его развития для последующего введения вакцины и в случае необходимости провести иммунологическую коррекцию.

Основным методом возможной коррекции специфического иммунитета является определение титров антител или интенсивности кожной реакции замедленного типа. Решение проблем индивидуализации вакцинации в значительной степени ускорилось бы, если бы мы заранее знали степень чувствительности каждого человека к отдельным инфекциям. Надежных методов определения такой чувствительности пока нет. Определенную помощь в составлении прогноза развития иммунитета может оказать определение иммунного статуса человека [37, 38].

Проведен модельный анализ эффективности ранней иммунизации населения. Показана возможность коррекции результатов первичной вакцинации с помощью повторной прививки путем подбора оптимальной интен-

Таблица 6. Изменение уровня антител после 3-й инъекции дивакцины против гепатитов А и В

Привит 71 человек	Титры антител через 1 мес после 3-й инъекции дивакцины			
	Увеличение	Без изменений	Уменьшение	Исчезно- вание
Гепатит А	47	15	7	2
Гепатит В	54	9	5	3

Существующая схема	Возможные схемы	
100 % ↓ В С Н	100 % ↓ В С Н	100 % ↓ В С Н
Те же 100 % ↓ В С Н	Только 60–80 % ↓ С Н	Только 30–40 % ↓ Н
Те же 100 % ↓ В С Н	Только 30–40 % ↓ Н	Только 10–20 % ↓ Н
	Только 10–20 % ↓ Н	

Рис. 2. Существующая и возможные схемы вакцинации: В — лица, имеющие высокие титры антител, С — средние титры, Н — низкие титры антител. %% — количество вакцинируемых лиц (в процентах).

сивности первой прививки [39]. Существуют методы математического прогнозирования иммунологической эффективности вакцинации (ревакцинации), основанные на иммунологическом мониторинге больших коллективов людей [40]. Однако проблема прогнозирования развития иммунного ответа на вакцину у отдельных людей практически не разрабатывается.

Коррекция уровня иммунитета по титрам антител у лиц повышенного риска доступна и реальна. В настоящее время в стране есть тест-системы для определения антител практически ко всем возбудителям инфекций. Следует использовать стандартные высокочувствительные диагностические препараты, прошедшие все стадии регистрации.

Коррекция иммунного ответа на вакцины проводится с целью:

- защиты слабо реагирующих на вакцину лиц;
- недопущения излишней иммунизации лиц с высокими защитными титрами антител;
- создания необходимого уровня иммунитета у всех привитых людей.

Процентное соотношение групп людей с разной интенсивностью иммунного ответа зависит от свойств вакцин и иммунологической активности вакцинируемых лиц. Ниже указаны средние значения, основанные на анализе изменения иммунного ответа у отдельных лиц, участвующих в клинических испытаниях вакцин:

- отсутствие иммунного ответа или слабый иммунный ответ — 5–15 % привитых;
- сильный и очень сильный иммунный ответ — 5–15 % привитых;
- иммунитет средней (достаточной) интенсивности — 70–85 % привитых;
- требуют коррекции развития иммунитета — 10–15 % привитых.

На первых порах принципы коррекции следует распространить на лиц из групп повышенного риска. В этом случае численность лиц, нуждающихся в коррекции иммунитета, будет в десятки раз меньше указанных цифр.

Учитывая необходимость индивидуального подхода к вакцинации, в отдельных случаях могут быть внесены некоторые изменения в существующие схемы иммунизации, регламентированные календарем прививок. По существующей традиционной схеме всех здоровых лиц многократно вакцинируют одинаковыми дозами препарата без учета индивидуальных особенностей этих лиц. И каждый раз после очередной дозы вакцины могут быть лица с низкими и высокими титрами антител. По предлагаемому вариантам схем рекомендуется не вакцинировать лиц, у которых титры антител уже высокие, а иммунизировать только лиц с низким, а в некоторых случаях — со средним уровнем антител (рис. 2).

Как правило, у слабо реагирующих лиц всегда удается достичь повышения титров антител. Процент абсолютно рефрактерных лиц, которые вообще не реагируют на какую-то вакцину, крайне низкий. Конечно, для изменения схемы вакцинации необходимы веские научные доказательства возможности такого изменения для каждого вида вакцин.

Персонализация вакцинации — это создание безопасного и эффективного иммунитета у каждого прививаемого человека с помощью коррекции вакцинации, введения вакцин, применения неспецифических средств иммунологической коррекции или изменение схемы вакцинации, если это необходимо. Основные положения такой коррекции:

- коррекция проводится на основании оценки иммунологической активности вакцинируемого по результатам определения титров антител или интенсивности кожных проб замедленного типа после введения вакцины;
- коррекция проводится с помощью: дополнительного введения вакцины, разных вариантов вакцин, разных доз, схем и методов вакцинации и дополнительных средств иммуностимуляции или отмены вакцинации в случае появления признаков гипериммунизации.

Преимущества индивидуализации вакцинации следующие:

- обеспечение более рациональной и эффективной вакцинации;
- достижение коллективного иммунитета в более короткие сроки;
- уменьшение риска развития поствакцинальных реакций и осложнений;
- решение этических проблем, связанных с недостаточной или избыточной иммунизацией.

В медицинской практике пока нет условий для определения уровня антител у всех вакцинируемых, хотя серологический мониторинг широко применяется для оценки коллективного иммунитета, а серологический скрининг — для подбора контингентов людей при испытании новых вакцин [41, 42].

Поскольку правильное проведение вакцинации уже сейчас позволяет предотвратить эпидемический процесс в отношении любой управляемой инфекции, можно полагать, что иммунологическая коррекция вакцинации не является столь необходимой. Однако процесс снижения заболеваемости в этом случае занимает многие годы, иногда десятилетия. Коррекция вакцинации значительно ускорит процесс снижения заболеваемости. Но главное, уже на ранних сроках иммунологической коррекции большая часть слабо реагирующих лиц будет защищена от инфекций, а другая часть населения — избавлена от гипериммунизации. Есть все основания полагать, что индиви-

дуальная коррекция вакцинации в значительной степени снижает частоту возникновения побочных реакций и осложнений после вакцинации. Затраты на внедрение методов иммунологической коррекции будут минимальными, они будут скомпенсированы отменой вакцинации гиперактивных людей. Произойдет частичное перераспределение объемов вакцин от тех, для кого они излишни, тем, кому они необходимы для дополнительной стимуляции иммунитета.

Следует подчеркнуть, что персонализация вакцинации это не утопия. Такой подход к вакцинации является необходимым и реальным. В некоторых исследовательских центрах уже в 1990-е годы осуществлялся дифференцированный подход к вакцинации лиц, страдающих тяжелыми видами патологии: иммунодефицитами, аллергией, злокачественными новообразованиями [43–45].

В соответствии с инструкциями по применению вакцин против бруцеллеза, туляремии и некоторых других инфекций вакцинацию проводят после предварительной оценки иммунитета у вакцинируемых с помощью одной из серологических или кожно-аллергических реакций. Прививкам подлежат лица с отрицательными реакциями.

Вот выдержки из Методических указаний МУ 3.1.3018–12 по серологическому контролю антитоксического иммунитета: «Подход к иммунизации лиц с отрицательным результатом после вакцинации против дифтерии (титр антител ниже 1:20) должен быть индивидуальным. При отсутствии защитных титров дифтерийных и столбнячных антител в сыворотке крови обследуемого ему следует провести дополнительную прививку. Лиц, у которых в ответ на дополнительную прививку не отмечается выраженная продукция дифтерийного и столбнячного антитоксинов, следует считать непривитыми. Их необходимо привить заново, считая сделанную прививку началом иммунизации». Замечательный документ, но, к сожалению, в широкой практике вакцинации он не используется.

Не все высказанные положения являются бесспорными. Существуют факторы, роль которых необходимо учитывать при разработке принципов персонализации вакцинации. Вот некоторые из таких факторов:

- относительность понятия «защитный титр» антител;
- роль разных классов антител в развитии иммунитета;
- аффинитет антител;
- длительность иммунитета и иммунологическая память.

Необходимы новые диагностические тест-системы для одновременного определения антител к возбудителям инфекций календаря прививок и методы прогнозирования силы иммунного ответа на основании результатов иммунометрии, необходимы научные исследования по разработке рекомендаций для врачей и пациентов.

Изменения ранее установленных доз и схем применения вакцин, а также использование дополнительных средств иммунологической коррекции должны быть научно обоснованы и одобрены в установленном порядке [46, 47].

II. Коллективный иммунитет

Эффективность вакцинации можно рассматривать с точки зрения создания персонального иммунитета, который обеспечивает защиту от заболевания, его тяжелых форм и осложнений. Эффективность вакцинации оценивается также как противоэпидемическое мероприятие по созданию коллективного иммунитета, снижению заболеваемости и прекращению вспышки инфекции. Основным мето-

дом создания коллективного иммунитета является вакцинация. Важно, чтобы используемые для этой цели вакцины имели высокую степень иммунологической и противоэпидемиологической эффективности [48].

Коллективный (стадный, популяционный) иммунитет — это приобретенный иммунитет отдельных групп, коллективов, контингентов и общества в целом против определенного вида инфекций. Это общее определение, хотя предложено несколько определений коллективного иммунитета, большинство из них включает упоминание о способности коллективного иммунитета защищать невакцинированных лиц.

Термин «стадный иммунитет» («herd immunity») был впервые введен в 1923 году, а его проявления были описаны в 30-е годы на примере коревой инфекции, когда после вакцинации большого числа детей заболеваемость корью уменьшалась не только среди вакцинированных детей, но и среди непривитых чувствительных к кори лиц и лиц, у которых после вакцинации отсутствовал специфический иммунитет к возбудителю кори [46].

Основным показателем напряженности коллективного иммунитета является значение « R_0 » — индекс (коэффициент) репродукции, который означает среднее число заражаемых лиц одним зараженным лицом [47]. Если $R < 1$, то коллективный иммунитет есть и заболеваемость уменьшается, если $R > 1$, то коллективного иммунитета нет и заболеваемость растет. R_0 — среднее количество лиц, которые могут быть заражены одним инфицированным больным в условиях гомогенной популяции, когда каждый человек коллектива может контактировать с любым членом этого же коллектива. Есть еще один показатель ПКИ — порог (охват в процентах), необходимый для появления коллективного иммунитета (табл. 7). Охват прививками не идентичен защищенности. Процент защищенности людей всегда меньше процента охвата прививками.

Достаточный охват необходим для создания коллективного иммунитета, снижения циркуляции возбудителя и уменьшения инфекционной заболеваемости. Процент охвата для большинства управляемых инфекций календаря прививок колеблется от 80 до 95 %.

Факторами, влияющими на распространение инфекций, являются: чувствительность населения к инфекциям, контагиозность инфекции, демографические особенности, природные, социальные факторы и пр. Восприимчивость населения принято выражать индексом контагиозности — отношением числа заболевших к числу неболеющих лиц, контактирующих с источником инфекции. Индекс выражается в дроби или в %. Например, корь 1 или 100 %, диф-

Таблица 7. R_0 и ПКИ при некоторых инфекциях

Болезни	Способ передачи	R_0	ПКИ, %
Корь	Воздушный	12–18	92–94
Коклюш	Воздушно-капельный	12–17	92–94
Дифтерия	Слюна	6–7	85
Краснуха	Воздушно-капельный	6–7	80–85
Оспа	Воздушно-капельный	5–7	80–86

Примечание. 1. R_0 — среднее количество лиц, которые могут быть заражены одним инфицированным больным в условиях гомогенной популяции.

2. ПКИ — порог (охват в процентах), необходимый для появления коллективного иммунитета.

терия 0,2 или 20 % и т.д. Порог охвата зависит от вида инфекции, прежде всего от ее контагиозности.

Среди инфекций календаря прививок наиболее высокий порог охвата характерен для кори, коклюша и дифтерии. Например, коревая инфекция обладает высокой степенью контагиозности, а после перенесенной болезни или вакцинации возникает прочный и длительный иммунитет, в механизме которого принимают участие гуморальные и клеточные факторы. Считается, что носительство при кори без появления признаков инфекции невозможно, а обнаружение антител в этом случае признается диагностической ошибкой [50].

Естественная восприимчивость к коклюшной инфекции высокая. Болеют лица всех возрастов. Трансплацентарный иммунитет не обеспечивает защиту от заболевания. Развивающийся иммунитет после перенесенного коклюша пожизненный. Повторно болеют лица пожилого возраста. Происходят периодические подъемы и спады заболевания с интервалом 3–4 года. При введении клеточной коклюшной вакцины возникает гуморальный и клеточный иммунитет, хотя не обнаруживается прямой связи между уровнем циркулирующих антител и восприимчивостью к инфекции. Бесклеточная коклюшная вакцина индуцирует преимущественно выработку антител, возникающий иммунитет слабее по сравнению с иммунитетом, который появляется после введения клеточной вакцины.

Резервуаром и источником заболевания дифтерией является больной человек или носитель токсигенных штаммов. Восприимчивость людей к инфекции высокая и определяется интенсивностью антитоксического иммунитета. Низкое содержание антитоксинов (0,03 АЕ/мл) обеспечивает защиту, но не препятствует носительству патогенных микробов. Антитоксические антитела передаются от матери плоду трансплацентарно и защищают новорожденного от заболевания в течение первого полугодия жизни ребенка. Дифтерийный анатоксин может прервать передачу инфекции, но плохо защищает от развития самого заболевания. Большую опасность представляет бактерионосительство, которое может длиться длительное время без регистрируемой заболеваемости. В начале 90-х годов произошло снижение коллективного иммунитета с небывалым подъемом заболеваемости дифтерией. Вспышку заболеваемости удалось купировать с помощью вакцинации.

В формировании коллективного иммунитета имеют значение все три звена эпидемиологического процесса: источник инфекции, передача возбудителя и особенности популяции людей.

Для оценки эпидемиологической ситуации в каждой развитой стране проводится мониторинг состояния коллективного иммунитета с помощью сбора информации о напряженности иммунитета среди населения. Устанавливаются лимиты — допустимый процент вакцинированных с уровнем антител ниже защитного.

На эффективность вакцинации, которая обеспечивает развитие специфического коллективного иммунитета, влияют следующие факторы:

- особенности возбудителя инфекции: вирулентность, контагиозность, способы передачи и пр.;
- свойства вакцины: иммуногенность, реактогенность, соответствие антигенов вакцин антигенам циркулирующих штаммов и пр.;
- особенности популяции людей, подлежащих вакцинации, ее генетические и фенотипические признаки;
- социальные факторы, профессиональные и возрастные особенности;
- географические и другие особенности среды.

Состояние коллективного иммунитета зависит от генетической изменчивости возбудителей инфекций. Известно, что новый микробный штамм, например штамм вируса гриппа, появляется в результате антигенного сдвига. При этом меняются эпитопы вируса, иммунная система и ее Т-клетки памяти не распознают новый штамм, выработка вируснейтрализующих антител прекращается и коллективный иммунитет теряет силу. Население становится чувствительным к новому штамму. Возникает новая вспышка заболевания, а затем развивается коллективный иммунитет новой специфичности. Основу коллективного иммунитета составляет «иммунная прослойка». Она выражается в проценте лиц, иммунных к данной инфекции. В состав иммунной прослойки входят:

- переболевшие данной болезнью;
- вакцинированные против этой инфекции;
- группа лиц, иммунизированных естественным путем циркулирующим штаммом возбудителя инфекции (случаи бессимптомной болезни, легкого заболевания без обращения за медицинской помощью);
- иммунизированные в результате вторичного иммунного ответа на перекрестные антигены введенной когда-то вакцины (феномен антигенного импринтинга или «первородного греха»).

Важной особенностью коллективного иммунитета является тот факт, что среди лиц, косвенно защищенных благодаря коллективному иммунитету, присутствует группа лиц, которые не могут быть привиты по медицинским показаниям. Это особая форма непрямой защиты неиммунных лиц, которые не болеют данной инфекцией благо-

Таблица 8. Оценка коллективного иммунитета при управляемых инфекциях

Инфекции	Методы определения титров антител	Контингент	Наличие антител	Допустимый % вакцинированных с уровнем антител ниже защитного
Дифтерия, столбняк	РПГА	Дети	Титры антител меньше 1:20	Не более 10 %
		Взрослые	Серонегативные	Не более 20 %
Корь	ИФА	Дети	Серонегативные	Не более 7 %
Краснуха	ИФА	Дети	Серонегативные	Не более 4 %
Паротит	ИФА	Дети, вакцинированные однократно	Серонегативные	Не более 15 %
	ИФА	Дети, вакцинированные двукратно	Серонегативные	Не более 10 %
Полиомиелит	РН	Дети	Серонегативные	Не более 20 % к каждому штамму



Рис. 3. Охват прививками от гриппа в России.

даря прекращению контактов с инфицированными лицами. К таким лицам относятся:

- — новорожденные, которых еще рано иммунизировать данной вакциной;
- — больные с врожденными и приобретенными иммунодефицитами, находящиеся на химиотерапии или радиационной терапии и другие случаи глубоких поражений иммунной системы;
- — лица с другими противопоказаниями к введению данной вакцины, например, с повышенной чувствительностью к компонентам вакцины;
- — часть здоровых невакцинированных лиц.

Охват людей прививками никогда не бывает 100-процентным. Всегда остается часть лиц, не привитых по тем или иным причинам. Их численность составляет 5–10 %. Кроме того, среди привитых примерно такой же процент составляют лица, у которых после вакцинации антитела отсутствуют или титры антител не достигают защитного уровня.

Вакцинация напрямую защищает вакцинированных от инфекций и косвенно — остальных непривитых лиц. При создании подавляющего большинства защищенных лиц больной человек все реже встречается непосредственно с людьми, восприимчивыми к данной инфекции, и заболеваемость данной инфекцией падает.

Таким образом, для снижения заболеваемости необходимо, чтобы иммунитет приобрела большая часть населения. Когда восприимчивых к инфекции лиц становится мало, циркуляция возбудителя сокращается. Коллективный иммунитет может исчезнуть из-за слишком частых отводов и отказов от вакцинации, ложных противопоказаний, как это было в отношении дифтерии и коклюша в бывшем Советском Союзе, Великобритании и Японии.

Хорошей моделью для изучения персонального и коллективного иммунитета является гриппозная инфекция (рис. 3). В 2014 году было привито 42,2 млн человек против гриппа, что составляет чуть больше 30 % населения.

Почему при гриппе такой низкий порог вакцинации позволяет ликвидировать вспышку заболевания? При расчете индекса репродукции и процента инфицированных лиц надо иметь в виду, что при вспышке инфекции всегда формируется группа лиц, которые иммунизируются естественным путем циркулирующими возбудителями без возникновения признаков заболевания. Вторая группа лиц — лица с легкой формой заболевания, которые не обращаются за медицинской помощью. Численность случаев и интенсивность естественной иммунизации можно установить по лабораторным данным, по появлению или повышению уровня специфических антител. Выявить таких

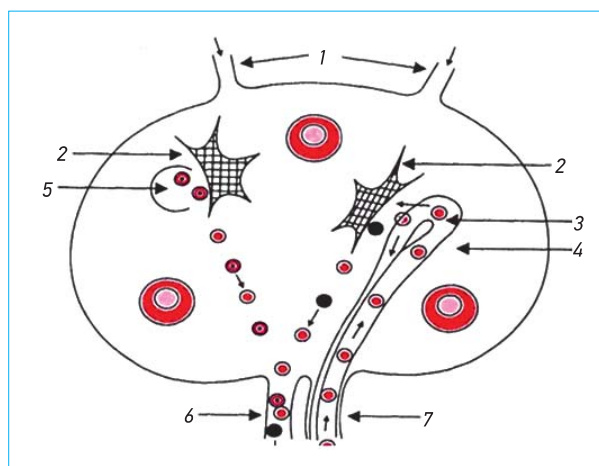


Рис. 4. Образование клеток памяти в лимфатическом узле: 1 — афферентный лимфатический сосуд, 2 — дендритная клетка, 3 — венулы с высоким эндотелием, 4 — паракортикальная зона, 5 — зародышевый центр, 6 — эфферентный лимфатический сосуд, 7 — кровеносный сосуд, ○ — наивная клетка, ⊙ — В-клетка памяти, ● — Т-клетка памяти.

лиц чрезвычайно трудно, хотя их роль в формировании иммунной прослойки и в становлении коллективного иммунитета, вероятно, огромная. Количество случаев естественной иммунизации бывает очень большим. Например, при гриппе у 50–80 % не вакцинированных взрослых людей появляются антитела без признаков заболевания [51].

Определенную роль в иммунной прослойке может играть феномен «первородного» греха или импринтинга [52, 53] Это обычный анамнестический эффект, наблюдаемый через большой промежуток времени после первичной встречи с антигеном. Этот промежуток может длиться десятилетия. Феномен проявляется при некоторых инфекциях, например, при гриппе и противогриппозной вакцинации. Он наблюдается у лиц старшего возраста, которые были инфицированы или вакцинированы много лет назад.

Существует также группа с естественной врожденной невосприимчивостью к инфекции. Она составляет лишь небольшой процент населения и ее трудно учесть при оценке коллективного иммунитета. Численность лиц в этой группе зависит от вида инфекции. Механизмы развития естественной врожденной резистентности к инфекциям связаны, вероятно, с супрессией или отсутствием генов, контролирующих рецепторы к данному возбудителю.

Коллективный иммунитет к конкретной инфекции может сохраняться многие годы. Основу длительного сохранения иммунитета составляет иммунологическая память, в которой участвуют клетки памяти (Т- и В-клетки памяти). Клетки образуются в лимфатических узлах, селезенке и лимфоидных образованиях кишечника из наивных лимфоцитов, которые еще не контактировали с антигеном.

На рисунке 4 показан процесс образования клеток памяти. Различают В-клетки памяти, которые образуются в экстрафолликулярной ткани, и Т-клетки памяти, которые находятся в паракортикальной области лимфатического узла. Клетки памяти слабо пролиферируют (исключение составляет небольшая группа Т-клеток памяти). При второй встрече с антигеном клетки памяти превращаются в эффекторные клетки, это обеспечивает быстрый и сильный вторичный иммунный эффект.

Можно предположить, что информация о специфическом иммунитете может храниться в комплексе, который

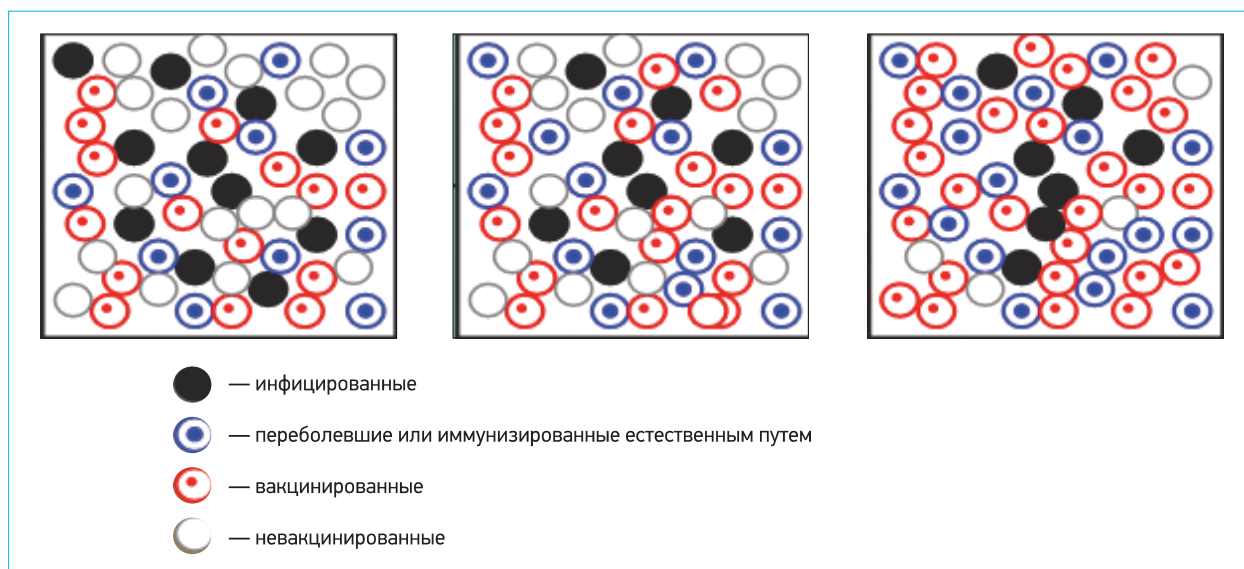


Рис. 5. Схема развития коллективного иммунитета.

состоит из эпитопов антигена и продуктов генов гистосовместимости I и II типов [53]. Продукты (антигены) гистосовместимости имеют молекулярные щели и расположенные по бокам спирали. В таких щелях и спиралях могут находиться осколки (эпитопы) антигенов вакцин. В таком виде эпитопы не расщепляются ферментами, это обеспечивает длительное существование иммунологической памяти.

На рисунке 5 указана схема развития коллективного иммунитета. В процессе вакцинации количество лиц, чувствительных к инфекции, уменьшается. Наступает момент, когда они перестают контактировать с инфицированными людьми, появляется коллективный иммунитет и заболеваемость уменьшается.

Существуют факторы, которые препятствуют развитию коллективного иммунитета. Среди них следует отметить следующие факторы:

- генетическая изменчивость микробных штаммов в результате антигенного дрейфа и шифта;
- бактерио- и вирусносительство;
- случаи «завозных» инфекций;
- большой процент непривитых лиц;
- большое количество привитых лиц без антител или с низкими титрами антител;
- антипрививочное движение.

Особенности коллективного иммунитета зависят от вида инфекции. Ставится под сомнение существование коллективного иммунитета при столбняке.

Нередко ставится под сомнение роль коллективного иммунитета в уменьшении инфекционной заболеваемости. Противники вакцинации считают, что вспышки инфекционных заболеваний можно ликвидировать и без вакцинации населения, а только с помощью соблюдения санитарно-гигиенических правил и повышения неспецифической сопротивляемости к инфекциям.

Конечно, с помощью одних гигиенических и лечебных мероприятий можно снизить инфекционную заболеваемость, однако не в такой степени и не столь эффективно, как это происходит при вакцинации [54, 55]. Для формирования иммунитета, в том числе коллективного иммунитета, решающее значение имеют специфичность иммунитета и иммунологическая память. Они отсутствуют

при проведении мероприятий, укрепляющих только неспецифический иммунитет.

В заключение следует указать основные направления работ по персонализации вакцинации и созданию коллективного иммунитета у вакцинированных людей:

- обеспечить развитие эффективного коллективного иммунитета и формирование иммунитета у слабо реагирующих лиц;
- оградить сильно реагирующих лиц от излишней иммунизации;
- сократить число лиц с поствакцинальными реакциями и осложнениями;
- уменьшить число случаев бактерио- и вирусносительства;
- решить отдельные вопросы медицинской этики, возникающие при вакцинации.

Индивидуализация вакцинации позволит в более короткие сроки достичь достаточной степени специфического «коллективного иммунитета» и снизить уровень инфекционной заболеваемости.

Литература

1. Брикко НИ. Оценка качества и эффективности иммунопрофилактики. Available from: <http://www.lvrach.ru/2012/10/15435557/22/02/2016>.
2. Борисевич ИВ, Мовсесянц АА, Горбунов МА, Медуницын НВ. Вакцины. Проблемы и перспективы. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2010; (3): 8–9.
3. Борисевич ИВ, Дармов ИВ, ред. Руководство по вакцинопрофилактике особо опасных инфекций. Куров; 2011.
4. Dhiman N, Bonilla R, Jacobson R, et al. Differential HLA Gene E expression in Measles Vaccine Seropositive and Seronegative Subjects: A Pilot Study. Scand J Infect Dis. 2003; (35): 332–6.
5. Höhler T, Gerken G, Notghi A, et al. HLA-DRB1*1301 and *1302 protect against chronic hepatitis. B J Hepatol. 1997; 26(3): 503–7.
6. Kaslow RA, Duquesnoy R, Van Raden M, et al. A1, Cw7, B8, DR3 HLA antigen combination associated with rapid decline of T-helper lymphocytes in HIV-1 infection. A report from the Multicenter AIDS Cohort Study. Lancet 1990; 335(8695): 927–30.
7. Khomenko AG, Litvinov VI, Chukanova VP, Pospelov LE. Tuberculosis in patients with various HLA phenotypes. Tubercle 1990; 71(3): 187–92.
8. Zavaglia C, Bortolon C, Ferrioli G, et al. HLA typing in chronic type B, D and C hepatitis. J Hepatol. 1996; 24(6): 658–65.

9. Koike S, Taya C, Kurata T, et al. Transgenic mice susceptible to polioviruses. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991; (88): 951–5.
10. Ren R, Constantini F, Gorgas EJ, et al. Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell* 1990; (63): 353–62.
11. Прилуцкий АС, Сохин АА, Майлян ЭА. Связь интенсивности выработки антител к возбудителям дифтерии и столбняка с некоторыми генетическими маркерами у детей, вакцинированных АКДС. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии* 1994; (2): 89–92.
12. Bothamley GH, Beck JS, Schreuder GM, et al. Association of tuberculosis and *M. tuberculosis*-specific antibody levels with HLA. *J Infect Dis* 1989; 159(3): 549–55.
13. Hayney MS, Poland GA, Jacobson RM, et al. The influence of the HLA DRB1*13 allele on measles vaccine response. *J Invest Med* 1996; (44): 261–3.
14. McNeil AJ, Yap PL, Gore SM, et al. Association of HLA types A1-B8-DR3 and B27 with rapid and slow progression of HIV disease. *Quarterly Journal of Medicine* 1996; 89(3): 177–85.
15. Краснянский ВП, Потрываева НВ, Борисевич ИВ, Градобоев ВН, Пашанина ТП, Пшеничных ВА. Оценка возможности получения инактивированной вакцины против лихорадки Ласса. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии* 1994; (6): 74–5.
16. Бондарева ТА, Калининский ВБ, Борисевич ИВ, Бондарев ВП, Фоменков ОО. Современное состояние и перспективы решения проблемы повышения эффективности экстренной профилактики и лечения системных бактериальных инфекций. *Молекулярная медицина* 2009; (5): 21–5.
17. Борисевич ИВ, Михайлов ВВ, Махлай АА. Патогенетические принципы специфической профилактики и лечения особо опасных вирусных геморрагических лихорадок. В кн.: *Патогенетические основы лечения острых инфекционных заболеваний. Сборник научных трудов к 70-летию со дня рождения академика В. И. Покровского. М., 1999. С. 236–44.*
18. Краснянский ВП, Потрываева НВ, Борисевич ИВ, Градобоев ВН, Пашанина ТП, Пшеничных ВА. Опыт получения инактивированной вакцины лихорадки Ласса. *Вопросы вирусологии* 1993; (6): 276–9.
19. Богачева НВ, Дармов ИВ, Борисевич ИВ, Крючков АВ, Печенкин ДВ. Динамика показателей клеточного иммунитета на фоне введения чумной живой сухой вакцины. *Клиническая лабораторная диагностика* 2009; (8): 24–6.
20. Георгиев ТБ. Об аутовакцинотерапии и изготовлении аутовакцин. Днепропетровск; 1958.
21. Егорова НБ, Мирошниченко ИВ, Крейнин ЛС. Иммунологическая реактивность людей к нескольким одновременно вводимым анатоксинам. В кн.: *Иммунологические аспекты эпидемиологии. Кишинев; 1977. С. 15–6.*
22. Попов ВФ. Корь и коревая вакцина Л-16. М.: Триада-Х; 2002.
23. Басова НН, Русакова ГВ, Готвянская ТП, и др. Результаты серологического контроля медицинских работников для коррекции прививок против дифтерии. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 1997; (5): 42–6.
24. Ерш АВ, Полтавченко АГ, Пьянков СА, и др. Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям. *Вопросы вирусологии* 2015; 60(1): 41–5.
25. Медуницын НВ. *Вакцинология. М.: Триада-Х; 2010.*
26. Platkov E, Berlin K, Glik Y, Fischbein A. Peculiarities of immune status among hospital employees following vaccination with recombinant DNA Hepatitis B vaccine. *Intern Journal on Immunorehabilitation* 1999; (12 Suppl): 77.
27. Миронов АН, Супотницкий МВ, Лебединская ЕВ. Феномен антитело-зависимого усиления инфекции у вакцинированных и переболевших. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2013; (3): 12–25.
28. Fulginiti FA, Eller JJ, Downie AW, Kempe CH. Altered reactivity to measles virus. Atypical measles in children previously immunized with inactivated measles virus vaccines. *JAMA* 1967; 202: 1075–80.
29. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* 1969; 89: 422–34.
30. Маркин ВА, Борисевич ИВ, Махлай АА. Особенности патогенеза вирусных особо опасных геморрагических лихорадок. В кн.: *Патогенетические основы лечения острых инфекционных заболеваний. Сборник научных трудов к 70-летию со дня рождения академика В. И. Покровского. М., 1999. С. 228–36.*
31. Борисевич ИВ, Потрываева НВ, Мельников СА, Евсеев АА, Краснянский ВП, Максимов ВА. Получение иммуноглобулина к вирусу Марбург на основе сыворотки крови лошадей. *Вопросы вирусологии* 2008; 53(1): 39–41.
32. Михайлов ВВ, Борисевич ИВ, Тиманькова ГД, Краснянский ВП, Потрываева НВ, Лебединская ЕВ, Черникова НК. Препарат, содержащий иммуноглобулин против лихорадки Эбола, из сыворотки крови лошадей, жидкий (иммуноглобулин Эбола). Патент на изобретение *RUS 2130318 05.07.1996.*
33. Краснянский ВП, Михайлов ВВ, Борисевич ИВ, Потрываева НВ, Мельников СА, Тиманькова ГД. Препарат, содержащий иммуноглобулин против лихорадки Марбург из сыворотки крови лошадей жидкий (иммуноглобулин лошадиный Марбург). Патент на изобретение *RUS 2257916 04.12.2003.*
34. Хмелев АЛ, Борисевич ИВ, Пантюхов ВБ, Пирожков АП, Сыромятникова СИ, Шапохина ИВ, Мельников СА, Шагаров ЕЕ. Использование морских свинок для оценки эффективности гетерологического иммуноглобулина против боливиийской геморрагической лихорадки. *Вопросы вирусологии* 2009; 54(4): 42–4.
35. Коза НМ, Фельдблюм ИВ, Маркович НИ, Паршин АА. Иммунологический надзор за дифтерией и корью как основа коррекции иммунитета в группах риска. В кн.: *Иммунологические реакции в диагностике, профилактике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными болезнями. Пермь; 1991. С. 66–71.*
36. Pollard G, Ovsyannikova I, Jacobson R. Identification of an association between HLA class II alleles and low antibody level after measles immunization. *Vaccine* 2002; 20: 230–8.
37. Петров РВ, Хаитов РМ, Пинегин БВ, и др. Оценка иммунного статуса человека при массовых обследованиях. *Иммунология* 1992; (6): 51–62.
38. Пинегин БВ, Чередеев АН, Хаитов РМ. Оценка иммунной системы человека: сложности и достижения. *Вестник РАМН* 1999; (5): 1–15.
39. Колесин ИД, Воробьева АА, Циберная АЮ. Модельный анализ эффективности ранней иммунизации населения. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика* 2015; (5): 21–6.
40. Иванченко ОИ, Лисицина ТС, Никулина НВ. Математическое прогнозирование иммунологической эффективности ревакцинации взрослых анатоксинами. В кн.: *Иммунологические реакции в диагностике, профилактике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными болезнями. Пермь; 1991. С. 71–4.*
41. Кошкина НА. Опыт организации серологического контроля защищенности от дифтерии медработников ЛПУ МПС. В кн.: *Современная вакцинология. Пермь; 1998. С. 46–7.*
42. Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета против управляемых инфекций (дифтерия столбняка, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит). *Методические указания МУ 3.1.1760–03.*
43. Костинов МП. Вакцинация детей с аллергическими заболеваниями. *Методические рекомендации. М.; 1991.*
44. Учайкин ВФ, Скачкова ЛО, Смирнов АВ, и др. Вакцинация детей с тяжелой соматической патологией. В кн.: *Современная вакцинология. Пермь; 1998. С. 33–4.*
45. Юшков ВВ, Юшкова ТА. Иммунодефициты и вакцинация. В кн.: *Современная вакцинология. Пермь; 1998. С. 24–5.*
46. Hedrich AW. The corrected average attack rate of measles among city children. *Am J Epidemiol* 1930; 11(3): 576–600.
47. Брико НИ. Оценка качества и эффективности вакцинации. *Медицинский вестник* 2015; (9): 1–6.
48. Брико НИ, Лобзин ЮВ, Баранов АА, и др. Оценка эффективности вакцинации: основные подходы и спорные вопросы. *Педиатрическая фармакология* 2014; 11(4): 8–14.
49. Покровский ВИ, Пак СГ, Брико НИ, Данилкин БК. *Инфекционные болезни и эпидемиология. Учебник для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008.*
50. Ющук НД, Кулагина МГ. *Грипп. В кн.: Инфекционные болезни. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009. С. 701–9.*

51. Жданов ВМ, Ершов ФИ. Укрощение строптивых: рассказы о вирусах и вирусологии. М.: Медицина; 1988.
52. Супотницкий МВ. Феномен антигенного импринтинга в эпидемических, инфекционных и поствакцинальных процессах. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2014; (3): 27–40.
53. Медуницын НВ, Миронов АН, Мовсесянц АА. Теория и практика вакцинологии. М.: Ремедиум; 2015.
54. Зверев ВВ, Семенов БФ, Хаитов РМ. Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.
55. Медуницын НВ. Нужны ли людям вакцины? М.: Компания БОРТЕС; 2006.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.
 Медуницын Николай Васильевич. Руководитель научного направления, д-р мед. наук, профессор, академик РАН.
 Олефир Юрий Витальевич. Генеральный директор, д-р мед. наук.
 Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, профессор.
 Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Медуницын Николай Васильевич; Medunitsyn2012@yandex.ru

Vaccination contribute to the development of personal and herd immunity

N. V. Medunitsyn, Yu. V. Olefir, V. A. Merkulov, V. P. Bondarev

Federal State Budgetary Institution
 «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
 of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The present article adduces the evidence in support of the need in the development of personalized vaccines and provides with case studies, substantiating the possibility of the mentioned approach. In order to personalize vaccines one should perform preliminary determination of antibody titers (or delayed-type hypersensitivity skin testing) and the subsequent correction of the immunity in patients with low titers of protective antibodies or hyperimmunization symptoms. Vaccine personalization does not require serious financial expenses. The article provides with the advantages of vaccine personalization and the measures that should be taken to achieve this goal. The difficulties of the personalization and the ways to overcome them are described in the article. Vaccine personalization does not require serious financial expenses. It will contribute to the development of preventive vaccination. Personalization of vaccines is necessary for achieving herd immunity, which leads to the reduction in the incidence of the mentioned infection and usually to the reduction of agent circulation. «Immune domain», which includes mostly recovered and vaccinated patients as well as naturally immunized individuals (by circulating infectious agents), plays a decisive role in the development of herd immunity. The effectiveness of herd immunity is reduced due to genetic variability of an agent, frequent vaccination refusals and rejections. Long-term herd immunity is stipulated by immunological memory.

Key words: vaccines; vaccination; differentiated approach; correction of immunity; protective antibody titers; vaccination personalization.

For citation: Medunitsyn NV, Olefir YuV, Merkulov VA, Bondarev VP. Vaccination contribute to the development of personal and herd immunity. BИOpreparaty. Prevention, Diagnosis, Treatment 2016; 16 (4): 195–207.

References

1. Briko NY. Assessment of the quality and effectiveness of immunization. Available from: <http://www.lvrach.ru/2012/10/15435557/> 22/02/2016 (in Russian).
2. Borisevich IV, Movsesyants AA, Gorbunov MA, Medunitsyn NV. Vaccines. Problems and prospects. BИOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie 2010; (3): 8–9 (in Russian).
3. Borisevich IV, Darmov IV, eds. Manual on vaccinoprophylaxis of especially dangerous infections. Kirov; 2011 (in Russian).
4. Dhiman N, Bonilla R, Jacobson R, et al. Differential HLA Gene E expression in Measles Vaccine Seropositive and Seronegative Subjects: A Pilot Study. Scand J Infect Dis. 2003; (35): 332–6.
5. H hler T, Gerken G, Notghi A, et al. HLA-DRB1*1301 and *1302 protect against chronic hepatitis. B J Hepatol. 1997; 26(3): 503–7.
6. Kaslow RA, Duquesnoy R, Van Raden M, et al. A1, Cw7, B8, DR3 HLA antigen combination associated with rapid decline of T-helper lymphocytes in HIV-1 infection. A report from the Multicenter AIDS Cohort Study. Lancet 1990; 335(8695): 927–30.
7. Khomenko AG, Litvinov VI, Chukanova VP, Pospelov LE. Tuberculosis in patients with various HLA phenotypes. Tubercle 1990; 71(3): 187–92.
8. Zavaglia C, Bortolon C, Ferrioli G, et al. HLA typing in chronic type B, D and C hepatitis. J Hepatol. 1996; 24(6): 658–65.
9. Koike S, Taya C, Kurata T, et al. Transgenic mice susceptible to polioviruses. Proc Nat Acad Sci USA 1991; (88): 951–5.
10. Ren R, Constantini F, Gorgasz EJ, et al. Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. Cell 1990; (63): 353–62.
11. Prilutsky AS, Sohin AA, Maylyan EA. The relationship of intensity of development of antibodies to the causative agents of diphtheria and tetanus with some genetic markers in children vaccinated with DTP. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 1994; (2): 89–92 (in Russian).
12. Bothamley GH, Beck JS, Schreuder GM, et al. Association of tuberculosis and M. tuberculosis-specific antibody levels with HLA. J Infect Dis. 1989; 159(3): 549–55.
13. Hayney MS, Poland GA, Jacobson RM, et al. The influence of the HLA DRB1*13 allele on measles vaccine response. J Invest Med. 1996; (44): 261–3.
14. McNeil AJ, Yap PL, Gore SM, et al. Association of HLA types A1–B8–DR3 and B27 with rapid and slow progression of HIV disease. Quarterly Journal of Medicine 1996; 89(3): 177–85.
15. Krasnyansky VP, Potryvaeva NV, Borisevich IV, Bondarev VP, Fomenkov OO. An evaluation of the possibility of obtaining an inactivated vaccine against Lassa fever. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 1994; (6): 74–5 (in Russian).
16. Bondareva TA, Kalininsky VB, Borisevich IV, Bondarev VP, Fomenkov OO. Modern state and prospects for the solution of the problem of the increase the efficacy of emergency prophylaxis and therapy of systemic bacterial infections. Molekulyarnaya meditsina 2009; (5): 21–5 (in Russian).

17. Borisevich IV, Mikhaylov VV, Makhlay AA. Pathogenetic principles of specific prevention and treatment of dangerous viral hemorrhagic fevers. In: Pathogenetic bases of treatment of acute infectious diseases. Collection of scientific works of the 70th anniversary of the birth of Academician V. I. Pokrovsky. Moscow; 1999. P. 236–44 (in Russian).
18. Krasnyansky VP, Potryvaeva NV, Borisevich IV, Gradoboev VN, Pashanina TP, Pshenichnov VA. Experience of preparing inactivated vaccine against Lassa fever. *Voprosy virusologii* 1993; (6): 276–9 (in Russian).
19. Bogacheva NV, Darmov IV, Borisevich IV, Kryuchkov AV, Pechenkin DV. The time course of changes in cell immunological parameters during administration of live dry plague vaccine. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2009; (8): 24–6 (in Russian).
20. Georgiev TB. On autovaccinotherapy and the manufacture of auto-vaccines. Dnepropetrovsk; 1958 (in Russian).
21. Egorova NB, Miroshnichenko IV, Kreylin LS. Immunological reactivity of people at the same time the injected toxoids. In: Immunological aspects of epidemiology. Kishinev; 1977: 15–6 (in Russian).
22. Popov V. F. Measles and measles vaccine L-16. Moscow: Triada-X; 2002 (in Russian).
23. Basova NN, Rusakova GV, Gotvyanskaya TP, et al. The results of serological testing of healthcare workers for the correction of vaccinations against diphtheria. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni* 1997; (5): 42–6 (in Russian).
24. Ersh AV, Poltavchenko AG, P'yankov SA, et al. The method of estimation of humoral immunity to vaccine-controlled children's viral infections. *Voprosy virusologii* 2015; 60(1): 41–5 (in Russian).
25. Medunitsyn NV. Vaccinology. Moscow: Triada-X; 2010 (in Russian).
26. Platkov E, Berlin K, Glik Y, Fischbein A. Peculiarities of immune status among hospital employees following vaccination with recombinant DNA Hepatitis B vaccine. *Intern Journal on Immunorehabilitation* 1999; (12 Suppl): 77.
27. Mironov AN, Supotnitsky MV, Lebedinskaya EV. The phenomenon of antibody-dependent enhancement of infection in vaccinated and convalescents. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* 2013; (3): 12–25 (in Russian).
28. Fulginiti FA, Eller JJ, Downie AW, Kempe CH. Altered reactivity to measles virus. Atypical measles in children previously immunized with inactivated measles virus vaccines. *JAMA* 1967; 202: 1075–80.
29. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol.* 1969; 89: 422–34.
30. Markin VA, Borisevich IV, Makhlay AA. Features of the pathogenesis of viral hemorrhagic especially dangerous fevers. In: Pathogenetic bases of treatment of acute infectious diseases. Collection of scientific works of the 70th anniversary of the birth of Academician V. I. Pokrovsky. Moscow; 1999. P. 228–36 (in Russian).
31. Borisevich IV, Potryvaeva NV, Melnikov SA, Evseev AA, Krasnyansky VP, Maksimov VA. Design of equine serum-based Marburg virus immunoglobulin. *Voprosy virusologii* 2008; 53(1): 39–41 (in Russian).
32. Mikhaylov VV, Borisevich IV, Timankova GD, Krasnyansky VP, Potryvaeva NV, Lebedinskaya EV, Chernikova NK. Preparation containing immunoglobulin against Ebola fever from horse blood serum and liquid Ebola immunoglobulin. Patent RUS 2130318 05.07.1996 (in Russian).
33. Krasnyansky VP, Mikhaylov VV, Borisevich IV, Potryvaeva NV, Melnikov SA, Timankova GD. Liquid preparation containing immunoglobulin efficient against Marburg fever from horse blood serum (horse immunoglobulin Marburg). Patent RUS 2257916 04.12.2003 (in Russian).
34. Khmelev AL, Borisevich IV, Pantyukhov VB, Pirozhkov AP, Syromyatnikova SI, Shatokhina IV, Melnikov SA, Shagarov EE. Use of guinea pigs to evaluate the efficacy of a heterologal immunoglobulin against Bolivian hemorrhagic fever. *Voprosy virusologii* 2009; 54(4): 42–4 (in Russian).
35. Koza NM, Feldblyum IV, Markovych NI, Parshin AA. Immunological surveillance of diphtheria and measles as a basis of correction of immunity in high-risk groups. In: Immunological reactions in diagnostics, prevention and epidemiological surveillance for infectious diseases. Perm; 1991. P. 66–71 (in Russian).
36. Polland G, Ovsyannikova I, Jacobson R. Identification of an association between HLA class II alleles and low antibody level after measles immunization. *Vaccine* 2002; 20: 230–8.
37. Petrov RV, Haitov RM, Pinegin BV, et al. Evaluation of the immune status of the person at mass inspections. *Immunologiya* 1992; (6): 51–62 (in Russian).
38. Pinegin BV, Cheredeev AN, Haitov RM. Assessment of the human immune system: complexities and achievements. *Vestnik RAMN* 1999; (5): 1–15 (in Russian).
39. Kolesin ID, Vorobieva AA, Tsibernaya AYU. Model analysis of the effectiveness of early immunization. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika* 2015; (5): 21–6 (in Russian).
40. Ivanchenko OI, Lisitsyna TS, Nikulina NV. Mathematical prediction of the immunological efficacy of revaccination of adults toxoid. In: Immunological reactions in diagnostics, prevention and epidemiological surveillance for infectious diseases. Perm; 1991. P. 71–74 (in Russian).
41. Koshkina NA. The experience of organization of control of serological protection against diphtheria health care workers. In: Modern vaccinology. Perm; 1998. P. 46–7 (in Russian).
42. Organizing and conducting serological monitoring of the state of collective immunity against controllable infections (diphtheria, tetanus, measles, rubella, mumps, polio). Guidelines MU 3.1.1760–03 (in Russian).
43. Kostinov MP. Vaccination of children with allergic diseases. Guidelines. Moscow; 1991 (in Russian).
44. Uchaykin VF, Skachkova LO, Smirnov AV, et al. Vaccination of children with severe somatic pathology. In: Modern vaccinology. Perm; 1998. P. 33–4 (in Russian).
45. Yushkov VV, Yushkova TA. Immunodeficiency and vaccination. In: Modern vaccinology. Perm; 1998. P. 24–5 (in Russian).
46. Hedrich AW. The corrected average attack rate of measles among city children. *Am J Epidemiol.* 1930; 11(3): 576–600.
47. Briko NI. Assessment of the quality and the effectiveness of vaccination. *Meditsinskiy vestnik* 2015; (9): 1–6 (in Russian).
48. Briko NI, Lobzin YuV, Baranov AA, et al. Evaluation of the effectiveness of vaccination: basic approaches and controversial. *Pediatric-heskaya farmakologiya* 2014; 11(4): 8–14 (in Russian).
49. Pokrovsky VI, Pak SG, Briko NI, Danilkin BK. Infectious diseases and epidemiology. Manual for doctors. Moscow: GEOTAR-Media; 2008 (in Russian).
50. Yushchuk ND, Kulagina MG. Flu. In: Infectious Diseases. National guideline. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. P. 701–9 (in Russian).
51. Zhdanov VM, Ershov FI. Taming of the Shrew: stories about viruses and virology. Moscow: Meditsina; 1988 (in Russian).
52. Supotnitsky MV. The phenomenon of antigenic imprinting in the epidemic, infectious and post-vaccination processes. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* 2014; (3): 27–40 (in Russian).
53. Medunitsyn NV, Mironov AN, Movsesyants AA. Theory and practice of vaccinology. Moscow: Remedium; 2015 (in Russian).
54. Zverev VV, Semenov BF, Haitov RM. Vaccines and vaccination. National guideline. Moscow: GEOTAR-Media; 2011 (in Russian).
55. Medunitsyn NV. Do people need the vaccines? Moscow: BORGES; 2006 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Medunitsyn NV. Head of scientific direction. Doctor of Medical Sciences, professor, academician of the Russian Academy of Sciences.

Olefir YuV. Director-General. Doctor of Medical Sciences.

Merkulov VA. Deputy Director-General for Evaluation of Medicinal Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Bondarev VP. Director of Centre for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Первые биоподобные лекарственные препараты моноклональных антител

Ж. И. Авдеева, А. А. Солдатов, Н. А. Алпатова, В. П. Бондарев, Ю. В. Олефир,
В. А. Меркулов, В. Д. Мосягин, Н. В. Медуницын

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 14.10.2016 г. Принята к публикации 17.11.16 г.

Обзор посвящен вопросам, связанным с особенностями разработки первых биоподобных/биоаналоговых («biosimilars») лекарственных препаратов на основе моноклональных антител. В июне 2013 года Комитет по лекарственным препаратам для медицинского применения (CHMP) Европейского медицинского агентства по лекарственным средствам (ЕМА) рекомендовал для лицензирования препараты Remsima и Inflectra как биоподобные оригинальному препарату Remicade®/Ремикейд® (инфликсимаб). В обзоре приведены общие принципы разработки указанных биоподобных/биоаналоговых биотехнологических препаратов. Отражены особенности проведения исследований по оценке качества, включающих характеристику физико-химических свойств, специфической биологической активности, а также сравнительных доклинических и клинических исследований, подтверждающих подобие разработанного и оригинального (референтного) препаратов. Представлены материалы, отражающие анализ полученных результатов сравнительных исследований, с целью оценки клинической значимости выявленных различий на этапе оценки качества. Приведены данные, обосновывающие возможность экстраполяции результатов, полученных при проведении клинических исследований, по одним показаниям на другие показания, утвержденные для оригинального препарата.

Ключевые слова: биоподобные/биоаналоговые («biosimilars») препараты; лекарственные препараты моноклональных антител; оценка качества; доклинические исследования; клинические исследования.

Библиографическое описание: Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Алпатова НА, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Мосягин ВД, Медуницын НВ. Первые биоподобные лекарственные препараты моноклональных антител. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (4): 208–218.

Лекарственные препараты моноклональных антител (МкАТ) характеризуются направленностью действия на патогенетически значимые антигенные структуры, экспрессированные на клетках иммунной системы, или эндогенные медиаторы, ответственные за проявления ее повышенной реактивности, в случае заболеваний аутоиммунной природы, или на антигены опухолевых тканей и ростовые факторы, ответственные за неконтролируемую пролиферацию опухолевых клеток, в случае онкологических заболеваний.

Разработка лекарственных препаратов МкАТ, направленных против провоспалительных цитокинов, является одним из наиболее ярких современных достижений в терапии системных воспалительных ревматических заболеваний. Наиболее успешно антицитокиновая терапия применена при лечении пациентов с ревматоидным артритом (РА). Антицитокиновая терапия, прежде всего, базировалась на нейтрализации фактора некроза опухолей альфа (ФНО α), роль которого в развитии патологических проявлений РА была детально изучена [1–3]. Первыми среди препаратов — антагонистов ФНО α , которые разрешены для клинического применения в США и странах ЕС, были Enbrel® (этанерцепт, 1998 г.) и Remicade® (инфликсимаб, 1999 г.). Указанные препараты позднее были рекомендованы также и для лечения других системных воспалительных заболеваний, таких как анкилозирующий спондилит (АС), псориаз, болезнь Крона, язвенный колит.

Ведущее значение иммунных и аутоиммунных нарушений при указанных заболеваниях, в первую очередь

при РА, не вызывает сомнений. Однако четко выстроенной картины патогенеза системных воспалительных аутоиммунных заболеваний до настоящего времени не установлено. Согласно современному представлению ведущую роль в патогенезе системных аутоиммунных заболеваний отводят гиперпродукции провоспалительных цитокинов, основным из которых является ФНО α , который координирует выработку других цитокинов, участвующих в развитии процессов воспаления, таких как ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17.

Наиболее изученным из данной группы заболеваний является РА — хроническое аутоиммунное системное воспалительное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением суставов по типу эрозивно-деструктивного прогрессирующего полиартрита. В основе патогенеза РА лежат генетически детерминированные аутоиммунные процессы.

Ведущим клиническим проявлением РА является суставной синдром; повреждение сустава начинается с воспаления синовиальной оболочки (синовита). Позднее, вследствие аутоиммунного воспалительного процесса, формируется паннус — грануляционная ткань, которую образуют активно пролиферирующие синовиальные, макрофагальные и фибробластные клетки и которая обогащена сосудами. Паннус проникает из синовиальной ткани в хрящ и разрушает его посредством воздействия ферментов (коллагеназы, других протеаз), индуцированных продукцией цитокинов внутри самого паннуса. Хроническое воспаление околосуставных тканей, капсул суставов, связок, сухожилий приводит к деформации суставов, подвы-

вихам, контрактурам. ФНО α и ИЛ-1 являются основными стимуляторами агрессивной пролиферации синовиальных клеток, а также ангиогенеза за счет стимуляции фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС/VEGF).

Кроме того, провоспалительные цитокины стимулируют продукцию RANKL — лиганда RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B), который вырабатывается синовиальными фибробластами, макрофагами (Мф) и Т-лимфоцитами. Экспрессия RANKL отмечена на клетках паннуса в месте соприкосновения с костной тканью и в области костных эрозий [4]. Рецептор RANK экспрессирован на остеокластах, при его взаимодействии с соответствующим лигандом (RANKL) происходит активация остеокластов, что сопровождается деструкцией суставных тканей.

Провоспалительный цитокин ФНО α синтезируется в основном Мф, а также другими типами клеток, включая лимфоидные, эндотелиальные, синовиальные клетки, фибробласты; синтезируется в мономерной и тримерной, растворимой и трансмембранной формах. ФНО α проявляет широкий спектр биологических функций путем связывания с рецепторами ФНО. Идентифицировано два типа рецепторов, имеющих молекулярную массу 55 и 75 кДа — ФНО-R1 и ФНО-R2. Рецептор ФНО-R1 экспрессирован на клетках большинства тканей, он может быть активирован путем связывания как с мембранно-ассоциированными, так и растворимыми тримерными формами ФНО. Рецептор ФНО-R2 экспрессирован только на клетках иммунной системы.

Общие положения

Первым препаратом МкАТ, который начал активно применяться в терапии РА, является инфликсимаб — химерные МкАТ (иммуноглобулины класса G — IgG), специфичные к ФНО α . Инфликсимаб с высокой степенью аффинности способен связываться как с растворимыми, так и с трансмембранно-ассоциированными формами ФНО α (tmTNF α). Активация рецептора ФНО α предотвращается за счет связывания инфликсимаба с ФНО α , таким образом, происходит нейтрализация всех проявлений биологической активности указанного провоспалительного цитокина и связанных с ней активностей других медиаторов. При этом наблюдается уменьшение продукции других провоспалительных цитокинов, а также таких медиаторов воспаления, как простагландины, кислородные радикалы и др., снижение активности металлопротеиназ, в частности, коллагеназы, участвующих в деструкции хрящевой и костной тканей.

В июне 2013 г. Комитет CHMP Европейского Агентства по лекарственным средствам (ЕМА) рекомендовал для одобрения первые биоподобные («biosimilars») препараты МкАТ — Remsima (производство «Celltrion») и Inflectra (производство «Hospira»). Указанные препараты, действующим веществом которых является инфликсимаб, разработаны как биоподобные оригинальному (референтному) препарату Remicade® (производство компаний «Johnson & Johnson» и «Merck»). Показания для применения, рекомендуемые дозы, лекарственная форма (лиофилизат для приготовления раствора для инфузий), состав вспомогательных веществ и выпускаемая дозировка (100 мг инфликсимаба во флаконе) соответствуют оригинальному препарату. Инфликсимаб — препарат СТ-P13, разработанный как биоподобный препарат МкАТ, произведен компанией «Celltrion Inc», Республика Корея.

В представленном регистрационном досье приведено описание технологического процесса производства активного вещества, включающее основные этапы хроматографической очистки, инактивации вирусов, нанофильтрации, ультрафильтрации/диафильтрации и т.д. с указанием контрольных точек и допустимых пределов оцениваемых показателей. Представлены материалы по валидации основных этапов производственного процесса, обеспечивающих полноту освобождения от вирусной контаминации и посторонних примесей, и методов оценки процесса очистки активного вещества путем определения родственных соединений и производственных примесей (белки клетки-хозяина, ДНК клетки-продуцента и векторная ДНК, белок А и компоненты среды). Представлены материалы, гарантирующие вирусную безопасность и безопасность в отношении других посторонних примесей, включая агенты, вызывающие губчатую энцефалопатию (TSE). Внутрипроизводственный контроль был достаточным для обеспечения безопасности производимого продукта и получения активного вещества СТ-P13 неизменно высокого качества.

В целом процесс разработки препарата проводился в соответствии с общими требованиями по разработке биотехнологических лекарственных препаратов и препаратов МкАТ [5–12]. Согласно регламентирующим документам сравнительные исследования процессов производства биоподобного/биоаналогичного и оригинального (референтного) препаратов не требуются.

Чтобы получить рекомендацию для одобрения препарата, заявителем были представлены результаты обширных сравнительных исследований разработанного и оригинального препаратов [13, 14]. Демонстрация подобия/сходства препаратов базировалась на результатах выполненной полной программы сравнительных исследований по оценке качества, доклинических и клинических исследований, что соответствует общим принципам разработки биоподобных/биоаналогичных («biosimilars») лекарственных препаратов и препаратов МкАТ [15–26].

При проведении сравнительных исследований по доказательству подобия СТ-P13, заявляемого как «biosimilar» препарату Remicade®, использовано несколько серий препаратов. Исследуемые серии препарата Remicade® были получены в странах ЕС.

Оценка качества препаратов

На этапе оценки качества препаратов исследованы как активная субстанция, так и готовая лекарственная форма. При выполнении многих аналитических исследований использовали СТ-P13 в виде активного вещества (субстанции), которое имеет аналогичный состав, что и готовый препарат (в жидком виде). Поскольку вспомогательные вещества, входящие в состав препарата СТ-P13, не мешают проведению аналитических исследований, активное вещество (инфликсимаб) не извлекали из активной субстанции.

СТ-P13, как другие иммуноглобулины класса G (IgG), является гликопротеином с одним сайтом N-гликозилирования (Asn 300) в домене CH2 каждой тяжелой цепи иммуноглобулина; O-связанные гликаны отсутствуют. При определении профиля олигосахаридов выявлены следующие гликановые структуры — G0F, Man5, G1F и G2F, соответствующие типичному олигосахаридному профилю МкАТ. В основном обнаруживались структуры с нулевым (G0F) или одним концевым остатком галактозы (G1F). Ка-

ждая тяжелая цепь состоит из 450 аминокислот с 11 остатками цистеина, и каждая легкая цепь состоит из 214 аминокислот с 5 остатками цистеина. Все цистеины в тяжелой и легкой цепях иммуноглобулина вовлечены во внутри- и межцепочечные дисульфидные связи.

Прежде всего, была проведена оценка качества разработанного препарата на его соответствие общим требованиям Европейской фармакопеи (ЕФ) к качеству лекарственных препаратов МкАТ [27].

Доказательство подобия/сходства разработанного и оригинального препаратов представлено на основании результатов сравнительных исследований:

- физико-химических свойств;
- биологической активности;
- профилей чистоты и примесей;
- профилей стабильности в ускоренных и стрессовых условиях.

При проведении сравнительных исследований физико-химических характеристик и показателей биологической активности препарата СТ-Р13 использован широкий спектр аналитических методик для определения структуры белка первичного, вторичного и более высокого порядка, посттрансляционных модификаций и изменений, связанных с микро-неоднородностью молекул белка, профилем гликозилирования, наличием и составом изоформ, определена чистота и биологическая активность СТ-Р13.

Идентичность первичной структуры, N- и C-концевых последовательностей СТ-Р13 и активного вещества Remicade® подтверждена, за исключением различий в содержании C-концевого лизина. В активной субстанции и конечном продукте СТ-Р13 выявлено большее соотношение тяжелых цепей IgG без лизина (K0) и более низкий уровень содержания тяжелых цепей с одним лизином (K1) по сравнению с Remicade®. Гетерогенность содержания C-концевого лизина в IgG, согласно руководству по биоподобным биологическим лекарственным продуктам, является приемлемой, поскольку мало вероятно, что она может оказывать отрицательное воздействие на эффективность и безопасность биоподобного («biosimilar») продукта. Заявителем представлены дополнительные экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что после введения СТ-Р13 человеку в сыворотке крови наблюдается быстрое расщепление C-концевого лизина. Таким образом, выявленные различия вряд ли могут повлиять на биологическую активность препарата *in vivo* и поэтому они не имеют клинической значимости.

При проведении сравнительных исследований СТ-Р13 и Remicade® выявлены различия в характере гликозилирования. Так, в препарате СТ-Р13 установлен более низкий уровень афукозилированных гликанов, чем в препарате Remicade®. В связи с этим предполагалось, что должна быть более низкая степень аффинности связывания МкАТ с рецептором FcγR11a, следовательно, и более низкий уровень биологической активности.

Проведены исследования с модуляцией агликозилирования инфликсимаба с целью оценки влияния на Fc-опосредованные эффекты препаратов. Установлено, что снижение уровня гликозилирования коррелирует с более низкой аффинностью связывания с FcγR11a рецептором (данные поверхностно-плазмонного резонанса — ППР) и снижением сродства связывания с C1q (данные иммуноферментного анализа — ИФА), как для СТ-Р13, так и препарата Remicade®. Результаты исследований всех серий СТ-Р13 (субстанции и готового препарата) показали, что количество агликозилированного белка было ниже

допустимого предела, поэтому результаты проведенных исследований с агликозилированием образцов не имеют прямого отношения к оценке эффективности. В противоположность этому, агалактозилирование не влияет на аффинность связывания с FcγR11a рецептором и связывания C1q — даже при снижении уровня галактозы до нуля, относительные значения аффинности связывания были близки к 100 %.

Для характеристики биологической активности и определения корреляции между профилем гликозилирования и проявлениями активности препаратов, опосредованной Fc-регионом иммуноглобулина, был проведен комплекс исследований с использованием методик *in vitro*.

При проведении сравнительных исследований биологической активности СТ-Р13 и Remicade® в тестах *in vitro* никаких различий не было обнаружено. Указанные тесты включали нейтрализацию активности ФНОα, связанную с индукцией апоптоза (на клетках линии Jurkat, несущих трансмембранную форму ФНОα — tmTNFα); оценку аффинности связывания с ФНОα (клеточные методики) и комплемент зависимой цитотоксичности (КЗЦ/СДС).

При проведении исследований, в которых условия экспериментов были приближены к физиологическим условиям организма, также никаких отклонений в проявлении активности препарата не обнаружено. Поскольку дизайн экспериментального исследования более адекватно отражал условия *in vivo*, сделано заключение, что результаты этих исследований имеют большую клиническую актуальность. Указанные исследования включали эксперименты с добавлением к культуре клеток сыворотки крови; реакцию двунаправленной аллогенной смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ) с использованием моноклеаров (Мн), содержащих FcγR11a клетки здоровых доноров или пациентов с болезнью Крона с различными генотипами (V/V, V/F и F/F); модель заживления раны с использованием культуры колоректальных эпителиальных клеток человека, индуцированных Мф.

Результаты проведенных исследований показали, что различия в аффинности связывания не влияют на способность инфликсимаба (препаратов СТ-Р13 и Remicade®) индуцировать субпопуляцию регуляторных макрофагов (регМф). Не было выявлено различий в соотношении регМф, индуцирующих или ингибирующих Т-клеточную пролиферацию, между препаратами СТ-Р13 и Remicade®, независимо от FcγR11a генотипа донора клеток. Мо/Мф (в том числе, регМф), индуцируемые СТ-Р13 или Remicade®, проявляли одинаковую способность в ускорении заживления искусственной раны, воспроизведенной на культуре эпителиальных клеток кишечника.

На основании анализа результатов проведенных исследований экспертами СМРП сделано заключение, что выявленное различие не следует рассматривать как клинически значимое, поскольку оно не влияет на проявления активности препарата СТ-Р13 при исследовании на экспериментальных моделях, наиболее приближенных к условиям *in vivo* и которые более соответствуют процессам, наблюдаемым у пациентов.

Оценка стабильности

Оценка стабильности проведена на уровне активной субстанции и готового лекарственного препарата. Установлено, что субстанция стабильна в течение 36 мес. при темпе-

ратуре хранения минус $(40 \pm 5)^\circ\text{C}$ и в течение 6 мес. — при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$.

Учитывая, что СТ-P13 был разработан в качестве биоподобного лекарственного препарата, проведено исследование стабильности лекарственного препарата согласно установленным требованиям [28]. Серии СТ-P13 (готового препарата) и Remicade® были оценены при различных условиях хранения (долгосрочные — при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$, условия «ускоренного старения» — при $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ / $(60 \pm 5)\%$ отн. вл., стрессовые условия — $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ / $(75 \pm 5)\%$ отн. вл.).

Для лекарственного препарата СТ-P13 были представлены данные по оценке стабильности, обосновывающие заявленный срок годности (36 мес.). Препарат Remicade® был «старше» (учитывая срок от момента выпуска препарата), чем препарат СТ-P13, поэтому представлены данные за 24 мес. хранения препарата. Результаты анализа серий, хранившихся при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ (заявленные условия хранения), свидетельствуют, что качество готового препарата СТ-P13 сопоставимо с качеством Remicade®; не отмечено различий показателей качества в течение срока сравнительных испытаний (24 мес.).

Результаты оценки стабильности при условиях «ускоренного старения» и стрессовых условиях показали, что препараты СТ-P13 и Remicade® имеют сходный профиль деградации, что подтверждает подобие разработанного и оригинального препаратов.

Приготовленные растворы для инфузий (препаратов СТ-P13 и Remicade®) стабильны в течение 48 ч при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ или $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$ / $(65 \pm 5)\%$ отн. вл.

Заявителем представлено детальное обоснование спецификации на активное вещество (субстанцию) с одинаковыми критериями приемлемости как при выпуске, так и в конце срока годности, гарантирующее стабильность активного вещества СТ-P13 при хранении в установленных условиях, а также представлено обоснование спецификации готового лекарственного препарата. В спецификацию включены показатели, оценка качества которых обеспечивает безопасность препарата, такие как подлинность, чистота/примеси, специфическая активность, микробиологическая чистота или стерильность, соответствующие для субстанции или лекарственного препарата.

Поскольку на характер гликозилирования могут влиять условия ферментации, процесс гликозилирования должен подвергаться тщательному контролю во время производственного процесса. По предложению экспертов СНМР в спецификацию активного вещества/субстанции СТ-P13 введена оценка гликозилирования (содержание афукозилированных гликанов G0+Man5) и сокращены допустимые пределы содержания для фукозилированных гликанов (G0F+G1F+G2F), а также включен показатель оценки заряженных гликанов (SA1+SA2). Установленные нормы соответствовали результатам контроля исследованных серий.

В целом результаты проведенных сравнительных исследований на этапе оценки качества свидетельствовали о том, что все основные физико-химические характеристики и показатели биологической активности разработанного препарата СТ-P13 были сопоставимы с аналогичными характеристиками оригинального (референтного) лекарственного препарата Remicade®. По мнению экспертов СНМР выявленные различия и уровни этих различий, с точки зрения качества, хорошо документированы и являются приемлемыми.

Доклинические исследования

Доклиническая разработка препарата СТ-P13 проводилась в соответствии с научными рекомендациями СНМР для биоподобных биотехнологических лекарственных препаратов, включая препараты на основе МкАТ [15, 17, 19, 25]. Программа сравнительного доклинического изучения препаратов СТ-P13 и Remicade® включала фармакодинамические, фармакокинетические и токсикологические исследования. Оценка первичных фармакодинамических свойств проведена с использованием широкого набора тестов *in vitro*, включая иммуногистохимические исследования перекрестной реактивности на тканях человека. Токсикологические исследования включали оценку токсикокинетики (ТК) и иммуногенности. Сравнительные исследования токсичности выполнены на крысах. Исследования токсичности и перекрестной реактивности выполнены в соответствии с требованиями GLP.

Фармакодинамика

Первичная фармакодинамика (ФД) препаратов изучена в лабораторных сравнительных исследованиях с использованием различных методик, позволяющих оценить аффинность связывания препаратов СТ-P13 и Remicade® с растворимыми мономерными и тримерными формами $\text{FНО}\alpha$ и трансмембранными формами $\text{FНО}\alpha$, $\text{FНО}\gamma$, Fc -рецепторами ($\text{Fc}\gamma\text{RI}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$, FcRn) и C1q компонентом комплемента. Проведены сравнительные исследования по оценке нейтрализующей активности $\text{FНО}\alpha$, проявлений K3C/CDC и антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (A3K/C/ADCC), нейтрализации апоптотического эффекта, перекрестной реактивности с различными тканями человека. В качестве препарата сравнения во всех этих исследованиях был использован препарат Remicade®. Данные результатов исследования отражены выше в разделе по оценке качества препаратов.

В целом, результаты исследований свидетельствовали о сопоставимости фармакодинамических свойств препаратов. Различие между препаратами СТ-P13 и Remicade® выявлено в аффинности связывания с $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ рецептором. Для установления значимости выявленных различий в связывании инфликсимаба с $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ проведены дополнительные исследования в отношении их влияния на проявления биологической активности препарата. Показано, что результаты исследований в условиях эксперимента, приближенных к физиологическим условиям, свидетельствуют об отсутствии влияния выявленных различий на качество препарата СТ-P13 и не могут оказывать отрицательного воздействия на его эффективность и безопасность.

Исследования по изучению вторичных фармакодинамических свойств, фармакологической безопасности, а также исследования по фармакодинамическому взаимодействию с другими лекарственными средствами не проводились, что соответствует рекомендациям руководства СНМР по биоподобным/биоаналогичным лекарственным препаратам на основе МкАТ (EMA/CHMP/BMWP/403543/2010) [25].

Фармакокинетика

Сравнительные фармакокинетические исследования препаратов СТ-P13 и Remicade® проведены на крысах линии Sprague-Dawley, результаты исследований позволяют оценить степень сопоставимости фармакокинетических параметров препаратов СТ-P13 и Remicade®.

При изучении абсорбции препараты СТ-P13 и Remicade® вводили 20 крысам однократно внутривенно в дозах 10 и 50 мг/кг (по 5 крыс в группе на дозу); время отбора образцов сыворотки крови в течение 14 сут (3 раза в первые сутки, затем через 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 14 сут). Метод выявления и количественной оценки содержания СТ-P13 или Remicade® (ИФА) в образцах сыворотки крови животных был валидирован.

Определение сопоставимости параметров фармакокинетики (ФК) основывалось на сравнении показателя AUC_{0-t} (AUC — площадь под кривой «концентрация–время» от начала дозирования до момента последней выборки). Установлено, что AUC_{0-t} для СТ-P13 и Remicade® подобны. Отношение средних геометрических значений AUC_{0-t} для СТ-P13 и Remicade® составило 96,66 % (90 %-ный доверительный интервал (ДИ) 79,69–117,23) при дозе 10 мг/кг. При дозе 50 мг/кг отношение средних геометрических значений AUC_{0-t} для СТ-P13 и Remicade® составило 112,70 % (90 %-ный ДИ 87,30–145,49). Наблюдаемая вариабельность оцениваемых значений связана с небольшим размером выборки (по 5 животных в каждой группе).

Другие оцениваемые фармакокинетические параметры, такие как C_{max} (максимальный пик концентрации в сыворотке крови), T_{max} (время достижения максимальной концентрации), MRT_t (среднее время удержания) высоко сходны и зависят от дозы. Профили кривой «сывороточная концентрация–время» для препаратов СТ-P13 и Remicade® после однократного внутривенного введения подобны.

Сделано заключение, что оцениваемые на крысах фармакокинетические параметры СТ-P13 при внутривенном введении в дозах 10 и 50 мг/кг аналогичны соответствующим параметрам ФК для препарата Remicade®.

Исследования по изучению распределения, метаболизма и выведения для СТ-P13 не проводились, также как и исследования фармакокинетического взаимодействия с другими лекарственными препаратами, что соответствует рекомендациям по биоподобным лекарственным препаратам на основе МКАТ [25].

В процессе проведения фармакокинетических исследований отмечено, что гибели животных, а также других изменений, связанных с введением препаратов, при клиническом наблюдении за животными не наблюдалось.

Токсичность

С целью оценки безопасности СТ-P13 выполнены три исследования на крысах по изучению токсичности при повторном введении препаратов. Поскольку перекрестная реактивность инфликсимаба с тканями любых видов животных, кроме шимпанзе не выявлена, исследования на крысах были выполнены с целью сравнения общей неспецифической токсичности препаратов СТ-P13 и Remicade®, включая сравнительную оценку иммуногенности. Исследования на любых видах животных, кроме шимпанзе, не способны идентифицировать проявления токсичности, связанные с непосредственным воздействием препарата на целевую мишень.

При исследовании субхронической токсичности одновременно изучали местнораздражающее действие препаратов, после окончания эксперимента животных подвергали эвтаназии и проводили патоморфологические исследования.

Для подтверждения правильности подбора дозы для последующих исследований на крысах первоначально

были проведены исследования по выбору доз с препаратом Remicade®. Препарат вводили в дозах 10 и 40 мг/кг внутривенно двукратно с перерывом в 1 неделю. Полученные результаты подтвердили, что уровень дозирования препарата Remicade® до 40 мг/кг не вызывает каких-либо токсических эффектов и может быть использован в дальнейших исследованиях.

Два последующих исследования были сравнительными, выполнены также на крысах, препараты (СТ-P13 или Remicade®) вводили внутривенно в дозах 10, 40 или 50 мг/кг по указанной выше схеме. Существенных отклонений ни в одном из исследований отмечено не было, за исключением минимального повышения количества ретикулоцитов, уровня тромбоцитов, а также минимальной гиперплазии клеток Купфера в печени. Отмечено снижение креатинкиназы при дозе препаратов 50 мг/кг. Следует отметить, что степень изменения при введении препаратов СТ-P13 и Remicade® была аналогичной. Никаких различий в проявлениях токсичности между препаратами СТ-P13 и Remicade® не установлено. Величина NOAELs (максимальная нетоксичная доза) для СТ-P13 и Remicade® составила 50 мг/кг/доза.

Следует отметить, что результаты исследований токсичности на крысах свидетельствуют о сопоставимой неспецифической токсичности препаратов СТ-P13 и Remicade®, однако они не могут служить доказательством их подобия в отношении токсичности, поскольку инфликсимаб фармакологически не активен для крыс. Также они не могут иметь существенного значения в отношении прогнозирования безопасности применения препарата у человека.

Иммуногенность

Анализ иммуногенности показал, что из всех 167 образцов сыворотки крови, взятых до начала эксперимента, после 1-го и 2-го введения и на 15-е сутки эксперимента, ни один из образцов сыворотки крови животных, получавших препараты, не был положительным по наличию антител к СТ-P13 или Remicade®. Исключение составлял один положительный ответ при исследовании образца крови, взятого до начала эксперимента. Исследования по определению антител, индуцированных введением препаратов, проведены с использованием метода полуколичественного ИФА, который был валидирован.

Токсикокинетика

Результаты исследования токсикокинетики (ТК) показали, что животные практически постоянно подвергались воздействию СТ-P13 или Remicade® на протяжении всего исследования. Воздействие препаратов увеличивалось по мере увеличения уровня дозы от 10 до 40 мг/кг/доза.

Исследования **острой токсичности, генотоксичности, канцерогенности и репродуктивной токсичности** не проводили, что согласуется с положениями руководства CHMP по подобным биотехнологическим лекарственным препаратам МКАТ [25].

Клинические исследования

Фармакокинетика

Исследование эквивалентности параметров ФК препаратов СТ-P13 и Remicade® проведено у 250 больных анкилозирующим спондилоартритом (АС), из которых 125 пациентов получали СТ-P13 и 125 — Remicade®. Пациентам внутривенно вводили препарат в дозе 5 мг/кг в 0, 2 и 6 не-

дели, затем один раз в каждую 8 неделю до 54 недели. Образцы крови для определения концентрации инфликсимаба при введении каждой дозы брали 3 раза (до введения, через 15 мин и через 1 ч после инфузии); после 5-й дозы дополнительно (через 8 и 24 ч), затем на 8, 15, 29, 43 и 57 сутки.

Для определения антител к инфликсимабу образцы крови брали на 14, 30, 54 неделе и после окончания исследования (8 неделя после последней дозы препарата).

Главной целью данного исследования являлось доказательство эквивалентности фармакокинетических параметров при равновесном состоянии (между 22 и 30 неделями).

Установлено, что профиль ФК в равновесном состоянии (после 5 доз) для препаратов CT-P13 и Remicade® (доза 5 мг/кг) является сопоставимым. Границы 90 %-ного доверительного интервала (ДИ) для отношений средних геометрических значений (в процентах) основных параметров ФК (C_{max} , ss — концентрация препарата максимальная и в равновесном состоянии, а также AUC_t) для исследуемого препарата и препарата сравнения находились в пределах, установленных для подтверждения биоэквивалентности (80–125 %). Для AUC_t это значение составляло 104,10 (ДИ 93,93–115,36) и для C_{max} , ss — 101,47 (ДИ 94,57–108,86).

Значения основных вторичных фармакокинетических параметров, таких как T_{max} (время достижения максимальной концентрации), C_{min} , ss (минимальная и равновесная концентрация), TS (период полувыведения), CL_{ss} (клиренс в равновесном состоянии), V_{ss} (кажущийся равновесный объем распределения) между 22 и 30 неделями, а также C_{max} и C_{min} после 9 доз применения препаратов CT-P13 или Remicade®, также были сопоставимы, что дополнительно свидетельствовало о подобии фармакокинетических параметров исследуемых препаратов.

Результаты указанного основного исследования были подкреплены данными по оценке ФК при обследовании больных активным РА, включенных в исследование эффективности и безопасности препаратов. Из 578 больных с РА 290 пациентов получали препарат CT-P13 и 288 — Remicade®. Оцениваемые показатели ФК (C_{min} , C_{max} и T_{max}) после 9 доз (3 мг/кг массы) были сходны. На основании проведенного анализа сделано заключение, что в целом результаты обоих клинических исследований совпадают и демонстрируют убедительные доказательства подобия профилей ФК препаратов CT-P13 и Remicade®.

Распределение

Среднее значение V_{ss} для препарата CT-P13 составило около 3,8 л, сходные значения определены для Remicade® (медиана V_{ss} составила 3,0–4,1 л), что указывает на преимущественное распределение инфликсимаба в сосудистом русле.

Адсорбция — исследования не проводили, так как препарат предназначен для внутривенного введения.

Дозовая зависимость не оценивалась. В клинических исследованиях использованы рекомендуемые терапевтические дозы препаратов, рассчитываемые на кг массы тела — 5 мг/кг при АС и 3 мг/кг при РА.

Исследование особых групп пациентов и фармакокинетические исследования взаимодействия лекарственных препаратов не проводили, поскольку это не требуется при разработке биоподобных лекарственных препаратов [19, 25].

Иммуногенность

Антитела к инфликсимабу определяли методом электрохемилюминесценции на 14, 30 и 54 неделях.

Установлено, что у 44 из 128 пациентов (34,4 %) при введении препарата CT-P13 и у 39 из 122 пациентов (32,0 %) при введении Remicade® как минимум в одном из образцов (соответствующих определенным временным точкам) выявлялся положительный результат на наличие антител к инфликсимабу. У большинства пациентов сероконверсия наблюдалась на 30 неделе лечения, однако у части пациентов сероконверсия отмечалась в более поздние сроки. Почти все выявляемые антитела были нейтрализующими, что и следовало ожидать, учитывая химерную природу инфликсимаба. Наличие антител существенно снижало системное воздействие инфликсимаба за счет увеличения его клиренса и уменьшения периода полувыведения, объема распределения и снижения концентрации в сыворотке крови. Однако влияние антител на параметры ФК было сопоставимым для обоих исследуемых препаратов. Экспертами СМР сделано заключение, что сравнительные исследования иммуногенного потенциала препаратов, проведенные в соответствии с требованиями руководящих документов [29, 30], свидетельствуют о подобии иммуногенных свойств исследуемых препаратов.

Оценка эффективности

Исследование эффективности и безопасности препаратов проведено в рамках III фазы с участием 606 пациентов с активным РА, получающих в комплексной терапии метатрексат (MTX), из них 302 человека получали препарат CT-P13 и 304 — Remicade®. Препараты CT-P13 и Remicade® вводили пациентам в дозе 3 мг/кг массы тела в виде 2-часовой внутривенной инфузии, в соответствии с утвержденной дозировкой для препарата Remicade® при указанной патологии. MTX назначали в дозе 12,5–25,0 мг/неделю для перорального или парентерального применения. Пациенты с РА получили 6 инфузий одного из препаратов в течение 1 года. При подаче заявления представлены результаты на 30 неделе наблюдения, во время рассмотрения документов дополнительно представлены результаты оценки эффективности на 54 неделе.

Отмечено, что на 30 неделе у пациентов, получающих CT-P13 или Remicade®, достигнут аналогичный положительный клинический ответ, оцениваемый по первичной конечной точке (ACR20 — улучшение на 20 % оцениваемых показателей) — у 184 из 302 пациентов (60,9 %), получавших препарат CT-P13, и у 178 из 304 пациентов (58,6 %), получавших Remicade®. Границы 95 %-ного ДИ оцениваемых значений были в пределах ± 15 % (от минус 6 до 10 %), что свидетельствует о терапевтической эквивалентности препаратов.

На 30 неделе результаты оценки эффекта лечения по вторичным конечным точкам (в частности, ACR50 и ACR70, снижение DAS28, SDAI и CDAI и увеличение SF-36) согласовывались с результатами оценки по первичной конечной точке и свидетельствовали о небольшом численном преимуществе в пользу препарата CT-P13. При оценке в более ранние сроки (14 неделя), которые могут быть наиболее чувствительными для выявления потенциальных различий эффективности препаратов, а также на 54 неделе также отмечено численное преимущество по количеству пациентов, достигших положительного клинического ответа, получавших препарат CT-P13. Полученные результаты подтверждают вывод о сопоставимости эффективно-

сти препаратов CT-P13 и Remicade®, при этом превосходство эффективности препарата CT-P13 оценено лишь как тенденция к превалированию некоторых оцениваемых показателей.

Дополнительные подтверждающие данные о сопоставимости эффективности препаратов были получены при исследовании 214 пациентов с АС, которые были включены в основное исследование ФК. Клинический ответ у пациентов с АС оценивали по критериям, рекомендованным Международной группой экспертов в области лечения АС (ASAS), — ASAS20 и ASAS40 до 54 недели. Результаты оценки эффективности у указанных пациентов с АС были сопоставимы между препаратами при наблюдении до 54 недели. Относительное количество пациентов, достигших ответа ASAS20 на 54 неделе, составило 67,0 % (71 из 106 пациентов) при лечении препаратом CT-P13 и 69,4 % (75 из 108) — при лечении препаратом Remicade®. При оценке границ 95 %-ного ДИ учитываемых значений по каждому из критериев (на 14, 30 и 54 неделе) не выявлено различий между исследуемыми препаратами.

Эффективность лечения больных АС, оцениваемая с использованием Басовских индексов определения степени активности и функциональных нарушений (BASDAI, BASFI и BASMI), была аналогичной для препаратов CT-P13 и Remicade®; степень снижения оцениваемых показателей была сопоставима для исследуемых препаратов.

Оценка безопасности

Клиническую безопасность оценивали во всех 3 клинических исследованиях, в которые был включен 871 пациент — 602 пациента с РА (по 301 пациенту в группах, получающих CT-P13 или Remicade®), 250 пациентов с АС (128 — получающих CT-P13 и 122 — Remicade®), а также 19 пациентов с РА, которые составляли дополнительную группу и длительно получали исследуемые препараты (10 — получающих CT-P13 и 9 — Remicade®). В целом, 455 (75 %) пациентов с РА и 210 (84 %) больных АС получили полный курс лечения препаратами (9 инфузий). 339 пациентов получали препарат CT-P13 в течение 1 года, результаты этих исследований составили базу данных по оценке безопасности препаратов.

Относительное количество пациентов, у которых наблюдали развитие серьезных нежелательных явлений, требующих лечения (TEAEs), было сходным — у больных РА указанные реакции наблюдались в 60 % случаев при лечении препаратом CT-P13 и в 61 % — при лечении Remicade®, у больных АС — в 65 и 64 % соответственно. В целом, тип и частота TEAEs были обусловлены фармакодинамическими и иммуногенными свойствами препаратов инфликсимаб и были сходны у больных РА и АС.

Тип и частота побочных реакций, наблюдаемых при применении препаратов CT-P13 и Remicade® в соответствующих исследованиях, как правило, были в целом сходны и новых проблем, связанных с безопасностью, выявлено не было. Численный дисбаланс в серьезных нежелательных явлениях наблюдался при применении препарата CT-P13 с большим числом серьезных инфекций, в том числе активного туберкулеза. Однако цифры были низкими и эксперты CHMP, на основе тщательного анализа всех имеющихся доказательств, высказали мнение о том, что наблюдаемое различие, скорее всего, является случайным. Кроме того, было отмечено, что нет научного обоснования, с точки зрения механизмов развития инфекции, для различий в защите организма хозяина от возбудителя инфекции при применении препаратов. Как указано в пла-

не управления рисками, серьезные инфекции, включая туберкулез, будут тщательно контролироваться на протяжении более длительного срока и в больших группах пациентов в рамках проведения постмаркетингового наблюдения за применением препарата в различных популяциях пациентов. Редкие побочные эффекты, известные для препарата Remicade®, такие как злокачественные новообразования и лимфопролиферативные заболевания, также будут тщательно контролироваться при постмаркетинговом наблюдении.

Клинические исследования разработанного препарата проведены в соответствии с общими требованиями к проведению клинических исследований и требованиями при разработке биоподобных лекарственных препаратов, получаемых по технологии рекомбинантных ДНК [25, 29–34].

Экстраполяция результатов оценки эффективности и безопасности

Вопрос об экстраполяции данных о клинической эффективности и безопасности при одних показаниях на другие, утвержденные для оригинального препарата МкАТ, может быть решен на основании комплексного заключения, базирующегося на результатах поэтапного сравнительного изучения, свидетельствующего о сопоставимости свойств препаратов, а также при представлении заявителем адекватного обоснования доказательства сопоставимости препаратов [25].

Заявителем представлен обзор литературы о роли ФНО α в развитии различных заболеваний, для лечения которых применяется препарат Remicade®, а также обсуждены потенциальные механизмы действия анти-ФНО препаратов. Согласно представленной информации результаты более детального изучения патогенеза РА, болезни Крона, псориаза, псориатического артрита и АС на клеточном и молекулярном уровнях за последние 30 лет показали, что указанные заболевания имеют много общих механизмов патогенеза, ранее неизвестных. Полученные данные позволяют предполагать, что эффекты блокады ФНО α при воспалении синовиальной оболочки сопоставимы при различных формах артрита. Исследования, проведенные с помощью биопсии у пациентов с РА, болезнью Крона и псориатическим артритом, также свидетельствуют о том, что препараты на основе антагонистов ФНО α имеют много общих механизмов действия при указанных видах патологии [24].

Для обоснования возможности экстраполяции результатов клинических исследований была воспроизведена модель воспалительного заболевания кишечника *in vitro*, в которой использована линия колоректальных эпителиальных клеток человека. Результаты исследований указывают на дозозависимое подавление препаратами секреции провоспалительных цитокинов (ИЛ-6 и ИЛ-8) ко-стимулированными человеческими эпителиальными клетками, данный эффект был сравним для обоих препаратов инфликсимаба. Также экспериментально было показано, что препараты CT-P13 и Remicade® способны подавлять апоптоз человеческих эпителиальных клеток за счет блокады растворимого ФНО α . Полученные данные *in vitro* в экспериментах с использованием человеческих клеток кишечника служат дополнительным обоснованием экстраполяции клинических данных на воспалительные заболевания кишечника. Предварительные клинические данные на небольшой когорте из 23 пациентов (15 — с болезнью Крона и 8 — с язвенным колитом) указывают на аналогичный клинический ответ при применении препа-

рата СТ-P13, сравнимый с историческими данными по ответу на препарат Remicade®.

В план постмаркетингового наблюдения, выполняемого в рамках фармаконадзора, заявитель включил больных воспалительными заболеваниями кишечника. Дополнительные сравнительные клинические исследования также будут проведены с использованием препаратов СТ-P13 и Remicade® при лечении пациентов с активной стадией болезни Крона.

Заключение

В рамках сравнительных исследований показано, что все основные физико-химические характеристики и биологическая активность разработанного препарата СТ-P13 высоко подобны/сходны с аналогичными показателями оригинального (референтного) препарата Remicade®/Ремикейд. При этом вывод о подобии исследуемых препаратов базируется на результатах сравнительных исследований, включающих оценку следующих показателей:

- первичная и вторичная структуры молекулы инфликсимаба, а также структура Fc-домена молекулы иммуноглобулина;
- основной профиль гликозилирования и профиль деградации при изучении стабильности препаратов;
- аффинность связывания с растворимыми мономерными и тримерными формами и трансмембранной формой ФНО α ;
- степень связывающей способности с растворимой формой ФНО α , оцениваемой в ряде экспериментов (нейтрализация биологической активности ФНО α , ингибирование продукции цитокинов и апоптоза на стимулированных клетках кишечника) и связывание с трансмембранной формой ФНО α (нейтрализация апоптоза клеток, экспрессирующих повышенный уровень tmФНО α);
- аффинность связывания с C1q компонентом комплекса, с Fc γ -рецепторами (Fc γ RIa, Fc γ RIIa и Fc γ RIIb), а также с неонатальным Fc-рецептором (FcRn);
- аффинность связывания с Fc γ RIIIb рецептором — нативным, экспрессированным на полиморфноядерных нейтрофилах (незначительные различия (снижение степени связывания) определены при исследовании с помощью поверхностного плазмонного резонанса, подобные тем, которые наблюдались при оценке связывания с Fc γ RIIIa (V и F гемизиготы));
- активность, обусловленная Fc-регионом иммуноглобулина — КЗЦ; индукция регуляторных макрофагов и проявление их эффектов (ингибирование пролиферации Т-клеток, заживление раны на модели колоректальных эпителиальных клеток).

Данные, полученные при проведении доклинических исследований, включающих изучение ФД, ФК, ТК и иммуногенности, также свидетельствуют о подобии препаратов. Оцениваемые на крысах фармакокинетические параметры СТ-P13 при внутривенном введении в дозах 10 и 50 мг/кг аналогичны соответствующим параметрам ФК для препарата Remicade®. Результаты исследований токсичности, выполненные на крысах, также свидетельствуют о сопоставимой неспецифической токсичности препаратов СТ-P13 и Remicade®. Отмечено, что они не могут служить доказательством их подобия в отношении токсичности, поскольку инфликсимаб фармакологически не активен для крыс, и не могут иметь решающего значения в плане прогнозирования безопасности применения у человека.

Данные клинических исследований позволили сделать следующие выводы:

- основные исследования ФК с участием пациентов с АС указывают на сравнимый профиль фармакокинетических параметров в равновесном состоянии, с 90 % уровнем ДИ между исследуемыми значениями ($C_{\max}$ и AUC) для двух препаратов, находящихся в пределах от 93 до 116 % (что соответствует стандартным параметрам интервала биоэквивалентности 80–125 %);
 - основные исследования эффективности, проведенные с участием больных РА, при оценке по ACR20, ACR50, ACR70 и по другим конечным точкам до 54 недели наблюдения, свидетельствуют о сопоставимости эффективности препаратов СТ-P13 и Remicade®. Так, 95 %-ный ДИ различий оцениваемых значений (ACR20 на 30 неделе) находился в допустимых пределах различий при оценке эквивалентности (± 15 %) для рандомизированной и всей популяции исследуемых пациентов;
 - данные оценки ФК при проведении исследований эффективности препаратов и данные по эффективности при проведении фармакокинетических исследований служат подтверждением подобия сравниваемых препаратов.
- Таким образом, данные, полученные при сравнительной оценке качества, доклинических и клинических исследований, позволяют сделать заключение о подобии препаратов СТ-P13 и Ремикейд®.

Положительное заключение для утверждения первых биоподобных препаратов МкАТ в Европейском Союзе (ЕС) открывает путь для утверждения других препаратов на основе МкАТ, срок действия патентов на которые истек или истекает в ближайшее время. К таким препаратам могут быть отнесены ритуксимаб (Rituxan®, Мабтера®), бевацизумаб (Авастин®), трастузумаб (Герцептин®), адалимумаб (Humira®), а также Fc-слипный белок этанерцепт (Enbrel®). К компаниям, которые разрабатывают препараты МкАТ, в том числе «biosimilars»-препараты, относятся, например, такие как «Celltrion», «Hospira», «Sandoz», внутренним потенциалом для разработки «biosimilars» обладают также такие инновационные компании, как «Amgen» и «Pfizer». В Российской Федерации разработку инновационных и биоподобных лекарственных препаратов МкАТ проводит компания ЗАО «Бионад». Опыт лицензирования первых биоподобных лекарственных препаратов на основе МкАТ в ЕС, основывающийся на анализе данных по критериям оценки проведенных сравнительных исследований по доказательству подобия препаратов, служит ориентиром и практической базой для решения вопроса о внедрении в медицинскую практику биоподобных препаратов МкАТ. Важно отметить, что для биоподобных (биоаналоговых) препаратов, как и для других лекарственных препаратов, при выходе их на рынок должен быть реализован план фармаконадзора с целью накопления опыта клинического применения, оценки безопасности и решения вопросов, в том числе тех, которые связаны с взаимозаменяемостью препаратов (переключением или чередованием применения биоподобного и оригинального (референтного) препаратов).

Литература

1. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* 1993; 36(12): 1681–90.
2. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Rev Immunol.* 1996; 14: 397–440.

3. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis J, Macfarlane JD, et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998; 41(9): 1552–63.
4. Pettit AR, Walsh NC, Manning C, Goldring SR, Gravalles EM. RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006. 45: 1068–76.
5. Guideline on development, production, characterization and specifications for monoclonal antibodies and related products. London. European Medicines Agency. 2008.
6. Guidelines for assuring the quality of monoclonal antibodies for use in humans. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-second report. Geneva, World Health Organization, 1991 (WHO Technical Report Series, No. 822).
7. ICH Q5A (R1) guideline. Quality of biotechnological products: Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. Geneva, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1999.
8. Note for guidance on virus validation studies: The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (CPMP/BWP/268/95); London. 14 February 1996.
9. Guidance on virus validation studies. The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. (EMA/CHMP/BWP/398498/2005); London. February 2009.
10. ICH Q2A guideline. Validation of Analytical Procedures. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1994.
11. ICH Q2B guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996.
12. ICH Q6B guideline. Note For Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/365/96).
13. Assessment report. Remsima (EMA/CHMP/589317/2013). 27 June 2013. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).
14. Assessment report. Inflectra (EMA/CHMP/589422/2013). 27 June 2013. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).
15. Guideline on similar biological medicinal products (EMA/CHMP/0437/2004). London. 2005.
16. Guideline on similar biological medicinal products (revision 1) (EMA/CHMP/0437/2004). London. 2014. Effective date: 30 April 2015.
17. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (EMA/CHMP/BMW/49348/2005). London. 2006.
18. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1) (EMA/CHMP/BWP/247713/2012). London. 22 May 2014. Effective date: 1 December 2014.
19. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: Non-clinical and clinical issues (revision 1). (EMA/CHMP/BMW/42832/2005). London. January 2015. Effective date: 1 July 2015.
20. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva. 19 to 23 October. 2009.
21. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). Annex 2 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixtieth report. Geneva, WHO Technical Report Series, No. 977. 2013.
22. WHO/KFDA Joint workshop on implementing WHO guidelines on evaluating similar biotherapeutic products. Meeting Report. Seoul, Republic of Korea 24 – 26 August. 2010 (Accepted 1 August 2011).
23. Guidance for industry. Quality consideration in demonstrating biosimilarity of a therapeutic protein product to a reference product. U. S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) April 2015.
24. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. М.: Гриф и К. 2013; с. 289–303.
25. Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies — non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMW/403543/2010). London. 2012.
26. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том IV. М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС. 2014; с. 31–53.
27. European Pharmacopoeia 6.0. Monoclonal antibodies for human use. 01/2008:2031.
28. ICH Q5C guideline. Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1995.
29. Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-Derived Therapeutic Proteins (EMA/CHMP/BMW/14327/2006). London, European Medicines Agency. London, January, 2007.
30. Guideline on immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for in vivo clinical use. (EMA/CHMP/BMW/86289/2010). London, European Medicines Agency. 2012.
31. Guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical product. Annex 3 in WHO Expert Committee on Selection and Use of Essential Medicines. Sixth report. Geneva, World Health Organization. 1995 (WHO Technical Report Series, No. 850).
32. ICH E6 guideline. Guideline for good clinical practice. Geneva, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1996.
33. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series. № 814. WHO Expert Committee on biological Standardization. October 2013 (Accessed 23 January 2014).
34. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть первая. М.: Гриф и К. 2012.
35. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008; 117(2): 244–79.

Об авторах

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

Авдеева Жанна Ильдаровна. Главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Солдатов Александр Алексеевич. Главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук.

Алпатова Наталья Александровна. Главный эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Олефир Юрий Витальевич. Генеральный директор, д-р. мед. наук.

Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р. мед. наук, профессор.

Мосягин Вячеслав Дмитриевич. Начальник управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Медуницын Николай Васильевич. Руководитель научного направления, д-р мед. наук, профессор, академик РАН.

Адрес для переписки: Авдеева Жанна Ильдаровна; Avd-cytok@yandex.ru

First available biosimilar monoclonal antibodies

Zh. I. Avdeeva, A. A. Soldatov, N. A. Alpatova, V. P. Bondarev, Yu. V. Olefir,
V. A. Merkulov, V. D. Mosyagin, N. V. Medunitsyn

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The review deals with the issues related to the special aspects of the development of the first available similar biopharmaceuticals/biological analogues («biosimilars») based on monoclonal antibodies. In June 2013 the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) of the European Medicines Agency (EMA) approved for licensing Remsima and Inflectra which are biosimilars of the brand-name product Remicade® (infliximab). The review describes the general principles of the development of the mentioned biosimilars. It highlights the features of the quality assessment studies, including characterization of the physical and chemical properties, specific biological activity, as well as comparative preclinical and clinical trials confirming the similarity of the candidate and the brand-name (reference) product. The review provides with the analysis of the results of comparative studies to assess the clinical relevance of the differences detected at the stage of quality assessment. The data substantiating the possibility of extrapolating the results obtained in clinical trials, against the approved standards for the brand-name product is provided.

Key words: biosimilar products; monoclonal antibody products; quality assessment; preclinical trials; clinical trials.

For citation: Avdeeva ZhI, Soldatov AA, Alpatova NA, Bondarev VP, Olefir YuV, Merkulov VA, Mosyagin VD, Medunitsyn NV. First available biosimilar monoclonal antibodies. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (4): 208–218.

References

- Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* 1993; 36(12): 1681–90.
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Rev Immunol.* 1996; 14: 397–440.
- Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis J, Macfarlane JD, et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998; 41(9): 1552–63.
- Pettit AR, Walsh NC, Manning C, Goldring SR, Gravallese EM. RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006. 45: 1068–76.
- Guideline on development, production, characterization and specifications for monoclonal antibodies and related products. London. European Medicines Agency. 2008.
- Guidelines for assuring the quality of monoclonal antibodies for use in humans. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-second report. Geneva, World Health Organization, 1991 (WHO Technical Report Series, No. 822).
- ICH Q5A (R1) guideline. Quality of biotechnological products: Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. Geneva, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1999.
- Note for guidance on virus validation studies: The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (CPMP/BWP/268/95); London. 14 February 1996.
- Guidance on Virus validation studies. The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (EMA/CHMP/BWP/398498/2005); London. February 2009.
- ICH Q2A guideline. Validation of Analytical Procedures. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1994.
- ICH Q2B guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996.
- ICH Q6B guideline. Note For Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/365/96).
- Assessment report. Remsima. (EMA/CHMP/589317/2013). 27 June 2013. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).
- Assessment report. Inflectra. (EMA/CHMP/589422/2013). 27 June 2013. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).
- Guideline on similar biological medicinal products (EMA/CHMP/0437/2004). London. 2005.
- Guideline on similar biological medicinal products (revision 1) (EMA/CHMP/0437/2004). London. 2014. Effective date: 30 April 2015.
- Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (EMA/CHMP/BWP/49348/2005). London. 2006.
- Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1) (EMA/CHMP/BWP/247713/2012). London. 22 May 2014. Effective date: 1 December 2014.
- Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: Non-clinical and clinical issues (revision 1) (EMA/CHMP/BWP/42832/2005). London. January 2015. Effective date: 1 July 2015.
- Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva. 19 to 23 October. 2009.
- Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). Annex 2 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixtieth report. Geneva, WHO Technical Report Series, No. 977. 2013.
- WHO/KFDA Joint workshop on implementing WHO guidelines on evaluating similar biotherapeutic products. Meeting Report. Seoul, Republic of Korea 24 – 26 August. 2010 (Accepted 1 August 2011).
- Guidance for industry. Quality consideration in demonstrating biosimilarity of a therapeutic protein product to a reference product. U. S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) April 2015.
- Guideline for the examination of drugs. v. I. Moscow: Grief and K. 2013; p. 289–303 (in Russian).
- Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies — non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BWP/403543/2010). London. 2012.
- Guideline for the examination of drugs. v. IV. Moscow: POLIG-RAF-PLYuS. 2014; p. 31–53 (in Russian).
- European Pharmacopoeia 6.0. Monoclonal antibodies for human use. 01/2008:2031.
- ICH Q5C guideline. Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products. International Con-

- ference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1995.
29. *Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-Derived Therapeutic Proteins (EMA/CHMP/BMWP/14327/2006)*. London, European Medicines Agency. London, January, 2007.
 30. *Guideline on immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for in vivo clinical use (EMA/CHMP/BMWP/86289/2010)*. London, European Medicines Agency. 2012.
 31. *Guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical product. Annex 3 in WHO Expert Committee on Selection and Use of Essential Medicines. Sixth report. Geneva, World Health Organization. 1995 (WHO Technical Report Series, No. 850)*.
 32. *ICH E6 guideline. Guideline for good clinical practice. Geneva, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1996*.
 33. *Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series. № 814. WHO Expert Committee on biological Standardization. October 2013 (Accessed 23 January 2014)*.
 34. *Guideline for conducting clinical trials of drugs. v. I. Moscow: Grief and K. 2012; 244 p. (in Russian)*.
 35. Tracey D1, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008 Feb; 117(2): 244–79.

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation. Petrovsky Boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Avdeeva ZhI. Chief expert of Office of expertise allergens, cytokines and other immunomodulators of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Soldatov AA. Chief expert of Office of expertise allergens, cytokines and other immunomodulators of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences.

Alpatova AA. Chief expert of Laboratory of immunology. Candidate of Biological Sciences.

Bondarev VP. Director of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor, academician of the Russian Academy of Sciences.

Olefir YuV. Director Heneral. Doctor of Medical Sciences.

Merkulov VA. Deputy Director Heneral for expertise of drugs. Doctor of Medical Sciences, professor.

Mosyagin VD. Head of Office of expertise allergens, cytokines and other immunomodulators of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Medunitsyn NV. Head of the scientific direction. Doctor of Medical Sciences, professor, academician of the Russian Academy of Sciences.

Новые антирабические рекомбинантные вакцины

Е. С. Седова, М. М. Шмаров

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 18.10.2016 г. Принята к публикации 17.11.2016 г.

Обзор посвящен проблемам получения новых антирабических вакцин с помощью рекомбинантных технологий. Новые подходы к созданию антирабических вакцин включают методы обратной генетики, получение антигенов вируса бешенства в культурах растительных клеток, получение вирусоподобных частиц и конструирование ДНК-вакцин и вакцин на основе различных вирусных векторов. Методы обратной генетики позволяют с помощью плазмид конструировать аттенуированные штаммы вируса бешенства. Накопление основного антигена вируса бешенства — гликопротеина G в культурах растительных клеток является перспективным с точки зрения получения «съедобных» вакцин, не требующих тщательной очистки антигена и многократного парентерального введения. Вирусоподобные частицы способны нести сразу несколько антигенов вируса бешенства, а также различные молекулярные адъюванты. ДНК-вакцины характеризуются простотой получения и невысокой стоимостью, однако требуют различных способов повышения иммуногенности. Большой интерес представляют кандидатные антирабические вакцины на основе различных вирусных векторов, экспрессирующих ген основного антигена вируса бешенства — гликопротеина G. На сегодняшний момент активно применяют ветеринарные вакцины на основе рекомбинантного вируса осповакцины и аденовируса человека пятого серотипа. Репликативно-дефектный аденовирус человека пятого серотипа является перспективным кандидатом и при создании вакцин для массовой иммунизации населения.

Ключевые слова: рекомбинантные вакцины; вирус бешенства; обратная генетика; культура клеток растений; вирусоподобные частицы; генетические вакцины.

Библиографическое описание: Седова ЕС, Шмаров ММ. Новые антирабические рекомбинантные вакцины. БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (4): 219–228.

Бешенство — это острая вирусная инфекция, вызываемая вирусами, принадлежащими к роду *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*, сопровождающаяся дегенерацией нейронов головного и спинного мозга с летальным исходом [1]. Бешенством страдают наземные и летающие млекопитающие, заболевание развивается после укуса или ослюнения раны инфицированным животным. Подавляющее большинство (~99 %) случаев инфицирования человека приходится на вирус бешенства (*Rabies virus*) [2]. Вирус бешенства — РНК-содержащий вирус размером 75–180 нм, окруженный липопротеиновой оболочкой, высланной изнутри матриксным М-белком. Снаружи от оболочки отходят шипы гликопротеина G, отвечающего за адсорбцию и внедрение вируса в клетку. Рибонуклеопротеин вируса бешенства состоит из однонитевой линейной минус-РНК и белков: N-белка (nucleocapsid), L-белка (large) и Р-белка (phosphoprotein) [1].

Ежегодно в мире от 12 до 15 млн человек нуждаются в медицинском вмешательстве после укуса потенциально бешеного животного. От 50000 до 100000 смертей в мире (преимущественно в странах Азии и Африки) ежегодно происходит в результате инфицирования вирусом бешенства [3]. В Российской Федерации за медицинской помощью в связи с нападением животных ежегодно обращаются более 360 тыс. человек [4]. Все пострадавшие проходят курс введений вакцины против бешенства в сочетании с антирабическими иммуноглобулинами. Несмотря на эти меры, в России ежегодно регистрируется от четырех до 22 случаев смерти от бешенства [5].

Для вакцинации против бешенства людей, входящих в группы риска (охотников, спелеологов и др.), а также людей, имевших контакт с бешеным животным, применяют инактивированные антирабические вакцины. Существ-

ующие на сегодняшний день вакцины эффективны, однако в ряде случаев их применение связано с риском развития побочных реакций аллергического, невропаралитического или энцефалитного характера. Кроме того, для достижения значимого иммунного ответа инактивированные вакцины требуют многократного введения, что часто является причиной неполного прохождения курса антирабической профилактики [6].

В последние десятилетия появились принципиально новые поколения вакцин — вакцин с заранее программируемыми свойствами. Возможность вносить направленные мутации в вирусный геном, удваивать содержание целевых генов, создавать химерные белки и синтезировать их в удобных системах — все это открыло широкие перспективы для разработки новых, в том числе антирабических вакцин. Выходят на мировой рынок или находятся на разных стадиях клинических исследований вакцины на основе рекомбинантного вируса бешенства или его белков, разрабатываются генно-инженерные вакцины на базе различных вирусных и ДНК-векторов [5–8].

Получение антирабических вакцин методами обратной генетики

В 1994 г. Conzelmann и Schnell описали способ получения штамма SAD-B19 вируса бешенства с помощью плазмид, кодирующих вирусный геном [9]. Сегодня методы обратной генетики используют для повышения иммуногенности вакцинных штаммов вируса бешенства, а также для конструирования новых аттенуированных штаммов.

Одним из способов повышения иммуногенности вакцинных штаммов вируса бешенства является получение их рекомбинантных вариантов, несущих дополнительный

ген, кодирующий гликопротеин G. Были получены несущие две копии гена гликопротеина G вакцинные штаммы SPBNGA-GA [10], rLEP-G (на основе LEP-штамма) [11] и HEP-dG (на основе штамма Flury-HEP) [12]. Все они показали более высокую иммуногенность и протективные свойства по сравнению с родительскими штаммами [6].

Для аттенуирования вируса бешенства проводят модификации или делеции генов, кодирующих G, P и M белки. Был получен рекомбинантный вирус бешенства ERAG3G, несущий гликопротеин G с аминокислотной заменой Arg333 → Glu333. Такой вирус потерял нейровирусные свойства и показал способность индуцировать высокие уровни нейтрализующих антител при иммунизации мышей и собак [13–15]. Аттенуированный вирус бешенства, полученный путем удаления M-гена у штамма SAD-B19, при иммунизации макаков-резусов индуцировал появление в 4 раза более высокого уровня вирус-нейтрализующих антител, чем коммерческая вакцина [16].

Также свои вирулентные свойства потеряли рекомбинантные вирусы бешенства rHEP-MIP1 α , несущий ген макрофагального белка воспаления 1 α , и LBNSE-GM-CSF, несущий ген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF). Оба этих вируса при иммунизации лабораторных животных обладали высокой иммуногенностью и протективными свойствами [17, 18]. На основе штамма вируса бешенства SPBN удалось получить непатогенный для мышей рекомбинантный вирус SPBN- γ , несущий ген мышиного интерферона гамма IFN- γ [19].

Рекомбинантный вирус бешенства RABV-mICAM-1 был получен путем введения в геном мышиного гена, кодирующего молекулу внутриклеточной адгезии ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Связывание ICAM-1 с мембранным белком LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen-1) В-клеток приводило к их активации и улучшению гуморального иммунного ответа. Было показано, что для достижения значительных иммунных реакций требовалась меньшая доза вируса, чем при иммунизации мышей родительским штаммом [20].

Следует отметить, что аттенуированные вакцины могут с успехом применяться для пероральной вакцинации животных, однако их применение для вакцинации людей сопряжено с рядом трудностей. Так введение аттенуированных вакцин совместно с антирабическим иммуноглобулином G может привести к инактивации вакцины и существенному снижению ее эффективности. Кроме того, аттенуированные вакцины могут нести риск остаточной вирулентности, а также вызывать аллергические и неврологические осложнения [6, 7].

Получение рекомбинантных белков вируса бешенства и их эпитопов с помощью клеток растений

Еще одним современным подходом к созданию антирабических вакцин является конструирование вакцин на основе рекомбинантных белков вируса бешенства и их эпитопов. Как известно, гуморальный иммунный ответ имеет решающее значение для защиты от вируса бешенства, а его основной мишенью является гликопротеин G вируса — единственный экспонированный на поверхности вириона белок. Поэтому гликопротеин G и его эпитопы — это наиболее перспективные объекты для создания рекомбинантных субъединичных вакцин [8]. Часто для наработки этих белков используют клетки растений. Антигены, синтезированные в клетках растений, не требуют сложных схем очистки и введения и способны попадать непосред-

ственно в пищеварительный тракт вместе с растением. Растительные вакцины характеризуются более низкой стоимостью, чем их аналоги, полученные с помощью других систем экспрессии, и хорошо подходят для массовой иммунизации населения [21].

Пионерское исследование, проведенное McGarvey и соавт. [22] показало, что гликопротеин G вируса бешенства может быть накоплен в томатах с использованием агробактериальной техники трансформации. В дальнейшем удалось повысить уровень продукции G-белка в растительных клетках листьев табака путем оптимизации кодонов в гене G-белка и использования сигнала удержания эндоплазматического ретикула (ЭР), что способствовало накоплению белка в ЭР и приводило к значительному повышению урожайности [21, 23].

Кукуруза также была использована для экспрессии гликопротеина G вируса бешенства штамма Внуково [21, 24]. Был достигнут высокий выход рекомбинантного белка в кукурузных зернах; пероральная иммунизация овец такой кандидатной вакциной приводила к формированию протективного иммунитета у 83 % животных. Также сообщалось о синтезе гликопротеина G вируса арктического бешенства в моркови [21, 25].

В клетках растений были получены фьюжн-белки, содержащие G-белок вируса бешенства и различные молекулярные адъюванты. Так фьюжн-белок, состоящий из G-белка вируса бешенства штамма ERA и В-субъединицы холерного токсина (СТВ), был получен в трансгенном табаке [26]. Также была получена культура «hairy roots» (культура изолированных корней растений) [27] томатов, экспрессирующая фьюжн-белок, содержащий гликопротеин G вируса бешенства и В-цепь рицина (RGP-RTB), которая обеспечивала эндоцитоз фьюжн-белка на поверхности слизистой. Гибридный белок RGP-RTB был способен индуцировать гуморальный иммунный ответ у мышей при пероральном введении без применения адъювантов [21, 28].

Помимо G-белка вируса бешенства, в растениях были экспрессированы и другие вирусные антигены. Так была показана стабильная экспрессия N-белка вируса арктического бешенства лисы в томатах и в *Nicotiana benthamiana* (табаке Бентхама) [21, 29].

В работе Yusibov и соавт. [30] был получен химерный вирус мозаики люцерны (AIMV, *Alstroemeria Mosaic Virus*), у которого белки оболочки представляли собой фьюжн-конструкции, включающие пептид Drg24, состоящий из В-клеточных эпитопов гликопротеина G и Т-клеточных эпитопов N-белка вируса бешенства. Вирус AIMV был успешно собран в культуре шпината. Иммунизация по схеме, предполагающей кормление мышей рекомбинантным шпинатом, приводила к индукции высокого уровня IgA (иммуноглобулина А) в кишечнике и уменьшению клинических признаков заболевания после заражения животных аттенуированным вирусом бешенства. В качестве «съемной» вакцины трансгенный шпинат вызывал увеличение уровня антирабических антител у добровольцев, уже иммунизированных коммерческой антирабической вакциной [21, 31].

Вирусоподобные частицы как антирабические вакцины

Вирусоподобные частицы (ВПЧ) представляют собой антигенные детерминанты вирионов без фрагментов генома. ВПЧ имитируют нативную вирусную частицу и, так как не несут вирусного генома, не могут быть причиной инфекции. ВПЧ являются перспективными вакцинными канди-

датами и способны индуцировать мощные гуморальный и клеточный иммунные ответы. Также ВПЧ могут нести различные инородные молекулы, что позволяет включать в их состав молекулярные адъюванты [32].

Важным этапом в разработке ВПЧ, несущих антигены вируса бешенства, является получение стабильных клеточных линий для их производства [33]. Такие клеточные линии получают с помощью плазмид или различных вирусных векторов. Так, Fontana и соавт. [34] с помощью лентивирусного вектора получили стабильную клеточную линию HEK-293 (Human Embryonic Kidney 293), экспрессирующую ВПЧ, несущие G-белок вируса бешенства. Иммуногенность данных ВПЧ была проверена в экспериментах на лабораторных мышах. Была подтверждена способность ВПЧ индуцировать образование нейтрализующих бешенство антител [34].

Kang с соавт. сконструировали ВПЧ EVLP-G, содержащие гликопротеин G, матричный белок M вируса бешенства штамма ERA и заякоренный на мембране фактор GM-CSF, призванный выполнять функции адъюванта. EVLP-G были успешно получены в клетках насекомых с помощью рекомбинантных бакуловирусов. Иммуногенность и протективность EVLP-G была оценена в эксперименте на мышах, показана индукция высоких титров антирабических антител и защита иммунизированных мышей от заражения вирусом бешенства [35].

Qi и соавт. сконструировали два вида ВПЧ, содержащих G и M-белки вируса бешенства штамма ERA и заякоренные на мембране флагеллин (EVLP-F) или B-субъединицу термолабильного энтеротоксина *E. coli* (EVLP-L) в качестве молекулярных адъювантов. ВПЧ были получены путем трансфекции клеток насекомых рекомбинантными плазмидами. Внутримышечное введение как EVLP-F, так и EVLP-L мышам и собакам приводило к быстрому появлению высоких титров нейтрализующих бешенство антител и вызывало индукцию высоких уровней CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, секретирующих ИФН- γ или ИЛ-4. При иммунизации EVLP-F наблюдалась активация Т-хелперов 1 типа, тогда как при иммунизации EVLP-L была показана активация Т-хелперов 2 типа. При этом иммунизированные животные были полностью защищены от заражения летальной дозой вируса бешенства [36].

Таким образом, ВПЧ, несущие антигены вируса бешенства, могут стать перспективными антирабическими вакцинами как для животных, так и для человека. Однако они требуют введения в их состав различных молекулярных адъювантов и разработки продуцирующих ВПЧ клеточных линий, оптимальных для массового производства вакцин.

Генетические антирабические вакцины

При создании генетической вакцины ген или участок генома патогена встраивается в вектор-носитель, который обеспечивает попадание генетического материала в клетки хозяина. В результате экспрессируемые клетками антигены патогена распознаются иммунной системой, что приводит к индукции как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. При получении генетических вакцин отпадает необходимость в выделении и очистке антигенов, а значит — в работе непосредственно с патогенами. Генетические вакцины можно разделить на две основные группы: ДНК-вакцины и векторные вирусные вакцины. Кроме того, перспективными, хоть и не столь популярными, для создания вакцин являются РНК-векторы.

Антирабические ДНК-вакцины

ДНК-вакцины — это бактериальные плазмиды, в которые включены целевой ген и регуляторные элементы, обеспечивающие его экспрессию после введения такой конструкции в организм. ДНК-вакцины хорошо переносятся, недороги и достаточно стабильны [37]. К настоящему моменту было разработано и опробовано на мышах [38], собаках [39] и приматах [40] несколько стратегий вакцинации против бешенства с помощью ДНК-вакцин.

Уровень иммунного ответа, индуцированного введением ДНК-вакцины, часто бывает недостаточным для формирования защитного иммунитета. Различные исследовательские группы применяли такие стратегии повышения интенсивности антирабического иммунного ответа при ДНК-вакцинации, как использование адъювантов (катионные липиды-DMRIE-DOPE [41], монофосфорил липид A [42]), а также применение молекулярных адъювантов [43], таких как хемокины и цитокины [6].

Еще одним направлением повышения иммуногенности ДНК-вакцин является разработка новых схем и способов их введения. Так внутрикожное введение с использованием генной пушки требует меньшее количество ДНК, необходимой для эффективной иммунизации [44]. Праймирование и бустирование с помощью ДНК-вакцин также показало свою эффективность при иммунизации кошек и собак [45]. Испытания антирабической подкожной ДНК-вакцины на собаках показали, что ее введение во внутреннюю часть уха обеспечивало выработку высоких титров вируснейтрализующих антител и длительную защиту от заражения вирусом бешенства [46].

Стародубовой и соавт. [47] был предложен оптимизированный дизайн G-белка вируса бешенства для использования его в составе ДНК-вакцин. Был сконструирован территориально-адаптированный антиген с консенсусной аминокислотной последовательностью гликопротеина вирусов бешенства, зарегистрированных на территории Российской Федерации, и вакцинного штамма Внуково-32. В культуре клеток, трансфицированной плазмидой rVAX1, несущей целевой ген, было зарегистрировано двукратное усиление экспрессии этого гена по сравнению с экспрессией гена вирусного гликопротеина штамма Внуково-32 в аналогичном векторе; накопление модифицированного G-белка в 20 раз превышало количество контрольного белка, синтезированного при использовании плазмиды с геном вирусного гликопротеина штамма Внуково-32 [47].

С целью усиления антирабического иммунного ответа Kaig и соавт. исследовали трафик G-белка вируса бешенства в различные клеточные компартменты. Были созданы плазмиды, несущие ген G-белка со следующими сигнальными последовательностями: тканевой активатор плазминогена, убиквитин и лизосомально-ассоциированный мембранный белок-1. Первые две последовательности и их комбинации позволяли усилить активацию CD4⁺ Т-клеток и выработку антител по сравнению с нативной конструкцией. Введение последовательности убиквитина приводило к усилению CD8⁺ ответа. Все эти конструкции при иммунизации мышей вызывали появление нейтрализующих антител и индукцию протективного иммунного ответа [48]. Также было показано, что пятикратное введение мышам после заражения бешенством конструкции, включающей ген G-белка со сродством к лизосомам, вместе с адъювантом Emulsigen-D приводило к полному предотвращению развития заболевания [49].

Антирабические вакцины на основе РНК-векторов

РНК-вакцины представляют собой РНК-векторы, несущие матричную РНК (мРНК) целевых антигенов. Они продемонстрировали свою эффективность при создании как противоопухолевых, так и вакцинных препаратов против различных инфекций. Кроме того, РНК-вакцины дешевы в получении и стабильны при хранении [50]. Schnee с соавт. сконструировали РНК-вектор, несущий матричную РНК (мРНК) гликопротеина репликативно-дефектного вируса бешенства (RABV-G). При иммунизации мышей такой вектор приводил к формированию антирабических антител, а также индукции как CD4+, так и CD8+ Т-клеток. Кроме того, иммунизированные животные были защищены от заражения вирусом бешенства. Аналогичные данные были получены при иммунизации свиней [51]. Антирабическая вакцина на основе РНК-вектора RNaActive® Rabies Vaccine (CV7201) на сегодняшний день проходит первую стадию клинических исследований на взрослых добровольцах [52].

Антирабические вакцины на основе вирусных векторов

Вирусные векторы представляют собой рекомбинантные вирусы, в геном которых встроен целевой ген с набором регуляторных элементов. Они имеют естественный меха-

низм проникновения в клетку, способны обеспечивать длительную экспрессию антигена, а вирусная оболочка защищает целевой генетический материал. Кроме того, они обладают способностью активировать врожденный иммунитет путем связывания генетического материала или белков оболочки с паттерн-распознающими рецепторами (TLR (toll like receptors), RIG-1 (retinoic acid-inducible gene 1) и др.). При этом происходит активация различных транскрипционных факторов, формирование очага воспаления и быстрая активация защитных реакций организма [53, 54].

Важным свойством вирусных векторов в качестве базы для создания антирабических вакцин является их способность индуцировать мощный иммунный ответ уже после однократного введения. Такие вакцины могли бы быть особенно востребованы в эндемичных по бешенству районах развивающихся стран, где часто не соблюдаются сроки и кратность вакцинации из-за недостаточного информирования населения, слабо развитой инфраструктуры и плохой доступности вакцинных препаратов [6]. Наиболее перспективные кандидатные антирабические вакцины на основе вирусных векторов представлены в таблице 1.

Первый вирусный вектор для иммунизации против бешенства был создан в 1984 году и представлял собой рекомбинантный вирус осповакцины V-RG, несущий ген G-белка вируса бешенства штамма ERA [55]. На его основе

Таблица 1. Наиболее перспективные антирабические вакцины на основе вирусных векторов

Вирусный вектор	Кандидатная вакцина	Полученные результаты	Литература
Рекомбинантный поксвирус	Вирус осповакцины V-RG, несущий ген G-белка вируса бешенства	Создана антирабическая вакцина RABORAL V-RG, которая широко применяется для оральной вакцинации диких животных с помощью приманок в Канаде и США	[55, 56]
Вирус чумы плотоядных	Вирус rCDVRV-G, несущий ген модифицированного (R333Q) G-белка вируса бешенства	Иммунизация мышей приводила к индукции вирус-нейтрализующих антител, как против вируса бешенства, так и против вируса чумы плотоядных	[59]
Рекомбинантный вирус парагриппа	Вирус праргриппа 5, несущий ген G-белка вируса бешенства	При однократной инъекции или интраназальном применении полностью защищал мышей от заражения бешенством, а также был способен защищать животных при введении после инфицирования	[61]
Рекомбинантный бакуловirus	Бакуловirus, экспрессирующий ген G-белка вируса бешенства, а также несущий G-белок на своей поверхности	При иммунизации мышей выявлены вирус-нейтрализующие антитела; протекция против заражения вирусом бешенства составила 100 %	[63]
Рекомбинантный аденовирус	Репликативно-компетентный аденовирус собак, несущий ген G-белка вируса бешенства	Вакцина показала иммуногенность и протективные свойства при иммунизации собак, кошек и хорьков	[66, 67, 68]
	Аденовирус птиц CEL0, несущий ген G-белка вируса бешенства	Иммунизация мышей приводила к индукции высоких титров нейтрализующих бешенство антител и протективного иммунного ответа	[69]
	Аденовирус шимпанзе, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства	Иммунизация нечеловекообразных обезьян (яванские макаки и макаки-резусы) приводила к появлению вирус-нейтрализующих антител и протекции от заражения вирусом бешенства	[70]
	Репликативно-компетентный аденовирус человека пятого серотипа AdG1.3, несущий ген G-белка вируса бешенства	Вакцина ONRAB® на основе AdG1.3 с 2012 г. разрешена как ветеринарная антирабическая вакцина для пероральной иммунизации в Канаде, сейчас проходит испытания в США	[72–82]
	Репликативно-дефектный аденовирус человека пятого серотипа nAd5-BD06-G, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства	Мыши, иммунизированные nAd5-BD06-G, продемонстрировали индукцию вирус-нейтрализующих антител и 90 % уровень защиты при заражении 120 ЛД ₅₀ вируса бешенства	[84]

была создана антирабическая вакцина RABORAL V-RG, которая широко применяется для оральной вакцинации диких животных с помощью приманок в Канаде и США [56]. Также были получены рекомбинантные поксвирус на-нареек и парапоксвирус, несущие гены антигенов вируса бешенства [57, 58]. Поксвирусные вакцины способны индуцировать защитный иммунный ответ после однократного перорального введения, однако их потенциальная реактогенность не позволяет использовать их для иммунизации человека. Таким образом, главная область применения таких вакцин — иммунизация диких животных с помощью приманок [7].

В качестве вирусного вектора для создания кандидатных антирабических вакцин также был использован ослабленный вирус чумы плотоядных rCDVRV-G, экспрессирующий ген модифицированного (R333Q) гликопротеина G вируса бешенства штамма Flury-LEP. Иммунизация лабораторных мышей rCDVRV-G приводила к индукции вируснейтрализующих антител как против вируса бешенства, так и против вируса чумы плотоядных. Такая вакцина удобна для вакцинации собак и других плотоядных животных [59]. Также для создания кандидатных ветеринарных антирабических вакцин в качестве вирусного вектора был использован вирус болезни Ауески [60].

Был разработан рекомбинантный вирус парагриппа 5 (PIV5), несущий ген G-белка вируса бешенства штамма LBSNE. Показано, что при одноразовой инъекции или интраназальном применении этот препарат полностью защищает мышей от летальной дозы вируса бешенства, а также способен защищать животных даже при введении после инфекции [61]. Иммунизация животных рекомбинантным вирусом леса Семлики, несущим ген G-белка вируса бешенства, приводила к индукции как гуморального, так и клеточного антирабического иммунного ответа [62].

Еще одним примером кандидатных антирабических вакцин на основе вирусных векторов является рекомбинантный бакуловир, экспрессирующий ген гликопротеина G вируса бешенства штамма ERA под контролем промотора цитомегаловируса, а также несущий гликопротеин G на своей поверхности. У мышей, иммунизированных таким рекомбинантным вирусом, выявлялись вируснейтрализующие антитела и защита от заражения вирусом бешенства составила 100 % [63].

Одними из самых распространенных вирусных векторов для создания кандидатных вакцин являются рекомбинантные аденовирусы (Ад). Ад обеспечивают высокий уровень экспрессии целевого трансгена и способны накапливаться в культуре клеток в высоких титрах. При этом ДНК Ад остается в экстрахромосомной форме [64]. При введении в организм Ад способны активировать рецепторы TLR-9 и RIG-I, также активация врожденного иммунитета происходит и в результате проникновения Ад в антиген-презентирующие клетки [65].

Для создания кандидатных антирабических вакцин использовались различные рекомбинантные Ад. Так, вакцина на основе репликативно-компетентного Ад собак, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства штамма SRV9, показала свою эффективность при иммунизации собак, кошек и хорьков [66–68]. Подобная вакцина призвана защитить собак как от бешенства, так и от аденовирусной инфекции. Было показано, что иммунизация мышей рекомбинантным аденовирусом птиц CELO (Chicken Embryo Lethal Orphan), несущим ген гликопротеина G вируса бешенства штамма TS-80, приводила к индукции у животных протективного антирабического иммунного ответа [69].

Создана кандидатная вакцина на основе аденовируса шимпанзе, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства штамма LEP. Иммунизация такой вакциной приводила к появлению вируснейтрализующих антител и протекции от заражения вирусом бешенства нечеловекообразных обезьян (яванские макаки и макаки-резусы) [70].

Наиболее популярным вектором для создания кандидатных вакцин является рекомбинантный аденовирус человека пятого серотипа (Ад5) [71]. Ад5, несущий гены антигенов вируса бешенства, хорошо зарекомендовал себя, как платформа для создания антирабических кандидатных вакцин. Так был получен репликативно-компетентный Ад5 AdRG1, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства штамма ERA под контролем раннего промотора SV40. AdRG1 показал свою эффективность при иммунизации мышей, собак и скунсов [72]. В дальнейшем с целью увеличения уровня экспрессии гликопротеина G был получен вирус AdRG1.3, где экспрессия целевого гена шла под контролем эндогенного Ад5 промотора. Было налажено производство антирабической вакцины на основе AdRG1.3 в клетках линии HEK 293, и в серии полевых испытаний, проведенных в 2006–2009 гг. в Канаде, была показана ее высокая эффективность при оральной вакцинации с помощью приманки для различных типов диких животных [73, 74]. В 2009 г. в рамках экспериментов по оценке безопасности аденовируса AdRG1.3 было показано, что негативное воздействие AdRG1.3 на различные типы животных маловероятно [75], продемонстрирована его генетическая стабильность [76]. Приманка с ветеринарной вакциной на основе AdRG1.3 ONRAB® в 2006 и 2007 гг. была разбросана над лесами канадской провинции Онтарио, и воздушное распределение вакцины было признано успешным способом контроля бешенства среди диких животных [77, 78]. Изучение образцов, взятых от различных целевых и нецелевых диких животных, показало, что репликация ONRAB® у животных скоротечна и вероятность его горизонтальной передачи крайне низка [79]. С 2012 г. в Канаде ONRAB® разрешена как ветеринарная антирабическая вакцина для пероральной иммунизации. На сегодняшний момент эта вакцина проходит испытания в США [80, 81]. Однако AdRG1.3 является репликативно-компетентным вирусом и изучение его биобезопасности при массовом выходе в окружающую среду пока нельзя считать окончательным [75, 76, 82].

Получение кандидатных вакцин для человека требует использования репликативно-дефектных Ад5, несущих делеции различных областей вирусного генома (E1, E2, E3, E4), необходимых для репликации вируса [83]. Wang и соавт. была создана кандидатная вакцина на основе репликативно-дефектного Ад5, экспрессирующего ген гликопротеина G вируса бешенства штамма BD06 [84]. Мыши, иммунизированные pAd5-BD06-G, продемонстрировали индукцию вируснейтрализующих антител и 90 % уровень защиты при заражении 120 ЛД₅₀ вируса бешенства. Таким образом, рекомбинантный репликативно-дефектный Ад5 может быть успешной платформой для создания антирабических вакцин для человека.

Заключение

Рассмотренные в данном обзоре рекомбинантные кандидатные вакцины могут быть использованы как для создания ветеринарных вакцин, так и для массовой иммунизации населения. Так, живые аттенуированные вакцины, а также генетические вакцины (ДНК-вакцины и вакцины на

основе вирусных векторов) перспективны для вакцинации свободноживущих животных с помощью приманок. Эффективность такого подхода продемонстрирована успешным применением вакцин на основе вирусов осповакцины и аденовируса человека пятого серотипа RABORAL V-RG и ONRAB® для иммунизации диких животных в Канаде и США. Кандидатные вакцины на основе вирусных векторов, например, вируса парагриппа и аденовирусов, могут вызывать протективный антирабический иммунитет уже после однократного введения, что является несомненным плюсом при разработке вакцин для массовой иммунизации населения. Наращивание вирусных антигенов с помощью культур растительных клеток позволит существенно удешевить процесс получения инактивированных антирабических вакцин как для животных, так и для человека. Кроме того, данные о протекции животных, которым вводили кандидатные генетические вакцины (ДНК-вакцины, а также вакцина на основе вируса парагриппа 5) уже после заражения вирусом бешенства, дают надежду на разработку новых типов препаратов для экстренной помощи лицам, имевшим контакт с инфицированными животными.

Литература

- Davis BM, Rall GF, Schnell MJ. Everything you always wanted to know about rabies virus (but were afraid to ask). *Annu Rev Virol*. 2015; 2(1): 451–71.
- World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies. Second Report. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2013; (982): 1–139.
- Willoughby RE Jr. Rabies: rare human infection — common questions. *Infect Dis Clin North Am*. 2015; 29(4): 637–50.
- Эпидемиологический надзор. О ситуации по бешенству в Российской Федерации [Интернет] 2015 [cited 2016 Sept 12] Available from: http://rospotrebnadzor.ru/deyatelnost/epidemiological-surveillance/?ELEMENT_ID=5610&sphrase_id=731393.
- Стародубова ЕС, Преображенская ОВ, Кузьменко ЮВ, Латанова АА, Ярыгина ЕИ, Карпов ВЛ. Вакцины против бешенства: современное состояние и перспективы развития. *Молекулярная биология* 2015; 49(4): 577–84.
- Kaur M, Garg R, Singh S, Bhatnagar R. Rabies vaccines: where do we stand, where are we heading? *Expert Rev Vaccines*. 2015; 14(3): 369–81.
- Rupprecht CE, Nagarajan T, Ertl H. Current status and development of vaccines and other biologics for human rabies prevention. *Expert Rev Vaccines*. 2016; 15(6):731–49.
- Hicks DJ, Fooks AR, Johnson N. Developments in rabies vaccines. *Clin Exp Immunol*. 2012; 169(3):199–204.
- Conzelmann KK, Schnell M. Rescue of synthetic genome RNA analogs of rabies virus by plasmid encoded proteins. *J Virol*. 1994; 68(2):713–9.
- Blanton JD, Self J, Niezgod M, Faber ML, Dietzschold B, Rupprecht C. Oral vaccination of raccoons (*Procyon lotor*) with genetically modified rabies virus vaccines. *Vaccine* 2007; 25(42): 7296–300.
- Tao L, Ge J, Wang X, Wen Z, Zhai H, Hua T, et al. Generation of a recombinant rabies Flury LEP virus carrying an additional G gene creates an improved seed virus for inactivated vaccine production. *Viral J*. 2011; 8: 454.
- Liu X, Yang Y, Sun Z, Chen J, Ai J, Dun C, et al. A recombinant rabies virus encoding two copies of the glycoprotein gene confers protection in dogs against a virulent challenge. *PLoS One* 2014; 9(2): e87105.
- Сафонов ГА, Баньковский ДО. Оценка антигенных и иммунологических свойств штамма ERA G333 вируса бешенства. *Вестник российской сельскохозяйственной науки* 2010; (5): 61–3.
- Yang DK, Nakagawa K, Ito N, Kim HH, Hyun BH, Nah JJ, et al. A single immunization with recombinant rabies virus (ERAG3G) confers complete protection against rabies in mice. *Clin Exp Vaccine Res*. 2014; 3(2): 176–84.
- Shuai L, Feng N, Wang X, Ge J, Wen Z, Chen W, et al. Genetically modified rabies virus ERA strain is safe and induces long-lasting protective immune response in dogs after oral vaccination. *Antiviral Res*. 2015; 121: 9–15.
- Cenna J, Hunter M, Tan GS, Papaneri AB, Ribka EP, Schnell MJ, et al. Replication-deficient rabies virus-based vaccines are safe and immunogenic in mice and nonhuman primates. *J Infect Dis*. 2009; 200(8): 1251–60.
- Zhao L, Toriumi H, Wang H, Kuang Y, Guo X, Morimoto K, et al. Expression of MIP-1 alpha (CCL3) by a recombinant rabies virus enhances its immunogenicity by inducing innate immunity and recruiting dendritic cells and B cells. *J Virol*. 2010; 84(18): 9642–8.
- Wen Y, Wang H, Wu H, Yang F, Tripp RA, Hogan RJ, et al. Rabies virus expressing dendritic cell-activating molecules enhances the innate and adaptive immune response to vaccination. *J Virol*. 2011; 85(4): 1634–44.
- Barkhouse DA, Garcia SA, Bongiorno EK, Lebrun A, Faber M, Hooper DC. Expression of interferon gamma by a recombinant rabies virus strongly attenuates the pathogenicity of the virus via induction of type I interferon. *J Virol*. 2015; 89(1): 312–22.
- Norton JE, Lytle AG, Shen S, Tzvetkov EP, Dorfmeier CL, McGettigan JP. ICAM-1-based rabies virus vaccine shows increased infection and activation of primary murine B cells in vitro and enhanced antibody titers in-vivo. *PLoS One* 2014; 9(1): e87098.
- Rosales-Mendoza S. Current developments and future prospects for plant-made biopharmaceuticals against rabies. *Mol Biotechnol*. 2015; 57(10): 869–79.
- McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, et al. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology* 1995; 13(13): 1484–7.
- Ashraf S, Singh PK, Yadav DK, Shahnawaz M, Mishra S, Sawant SV, et al. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *J Biotechnol*. 2005; 119(1): 1–14.
- Loza-Rubio E, Rojas-Anaya E, Lypetz J, Olivera-Flores MT, Gómez-Lim M, Tapia-Pérez G. Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein. *Vaccine* 2012; 30(37): 5551–6.
- Rojas-Anaya E, Loza-Rubio E, Olivera-Flores MT, Gímez-Lim M. Expression of rabies virus G protein in carrots (*Daucus carota*). *Transgenic Res*. 2009; 18(6): 911–9.
- Roy S, Tyagi A, Tiwari S, Singh A, Sawant SV, Singh PK, et al. Rabies glycoprotein fused with B subunit of cholera toxin expressed in tobacco plants folds into biologically active pentameric protein. *Protein Expr Purif*. 2010; 70(2): 184–90.
- Skarjinskaia M, Ruby K, Araujo A, Taylor K, Gopalasamy-Raju V, Musychuk K, et al. Hair roots as a vaccine production and delivery system. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2013; 134: 115–34.
- Singh A, Srivastava S, Chouksey A, Panwar BS, Verma PC, Roy S, et al. Expression of rabies glycoprotein and ricin toxin B chain (RGP-RTB) fusion protein in tomato hairy roots: A step towards oral vaccination for rabies. *Mol Biotechnol*. 2015; 57(4): 359–70.
- Perea Arango I, Loza Rubio E, Rojas Anaya E, Olivera Flores T, Gonzalez de la Vara L, Gómez Lim MA. Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high levels and evaluation of immune responses in mice. *Plant Cell Reports* 2008; 27(4): 677–85.
- Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu ZF, Steplewski K, Hooper DC, et al. Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(5): 2481–5.
- Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleysh N, Kean RB, Mikheeva T, et al. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 2002; 20(25–26): 3155–64.
- Lua LHL, Connors NK, Sainsbury F, Chuan YP, Wibowo N, Middelberg APJ. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol Bioeng*. 2014; 111(3): 425–40.
- Hua RH, Li YN, Chen ZS, Liu LK, Huo H, Wang XL, et al. Generation and characterization of a new mammalian cell line continuously expressing virus-like particles of Japanese encephalitis virus for a subunit vaccine candidate. *BMC Biotechnol*. 2014; 14: 62.
- Fontana D, Kratje R, Etcheverrigaray M, Prieto C. Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. *Vaccine* 2015; 33(35): 4238–46.
- Kang H, Qi Y, Wang H, Zheng X, Gao Y, Li N, et al. Virus-like particles containing membrane-anchored GM-CSF enhances the immune response against rabies virus. *Viruses* 2015; 7(3): 1134–52.

36. Qi Y, Kang H, Zheng X, Wang H, Gao Y, Yang S, et al. Incorporation of membrane-anchored flagellin or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit enhances the immunogenicity of rabies virus-like particles in mice and dogs. *Front Microbiol.* 2015; 6: 169.
37. Abdulhaqq SA, Weiner DB. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunol Res.* 2008; 42(1–3): 219–32.
38. Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J, Ertl HC. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 1994; 199(1): 132–40.
39. Perrin P, Jacob Y, Aguilar-Sütien A, Loza-Rubio E, Jallet C, Desmazières E, et al. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* 1999; 18(5–6): 479–86.
40. Lodmell DL, Ray NB, Parnell MJ, Ewalt LC, Hanlon CA, Shaddock JH, et al. DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. *Nat Med.* 1998; 4(8): 949–52.
41. Margalith M, Vilalta A. Sustained protective rabies neutralizing antibody titers after administration of cationic lipid-formulated pDNA vaccine. *Genet Vaccines Ther.* 2006; 4: 2.
42. Lodmell DL, Ray NB, Ulrich JT, Ewalt LC. DNA vaccination of mice against rabies virus: effects of the route of vaccination and the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL). *Vaccine* 2000; 18(11–12): 1059–66.
43. Pinto AR, Reyes-Sandoval A, Ertl HCJ. Chemokines and TRANCE as genetic adjuvants for a DNA vaccine to rabies virus. *Cell Immunol.* 2003; 224(2): 106.
44. Lodmell DL, Parnell MJ, Bailey JR, Ewalt LC, Hanlon CA. Rabies DNA vaccination of non-human primates: post-exposure studies using gene gun methodology that accelerates induction of neutralizing antibody and enhances neutralizing antibody titers. *Vaccine* 2002; 20(17–18): 2221–8.
45. Borhani K, Ajorloo M, Bamdad T, Mozghani SH, Ghaderi M, Gholami AR. A comparative approach between heterologous prime-boost vaccination strategy and DNA vaccinations for rabies. *Arch Iran Med.* 2015; 18(4): 223–7.
46. Bahloul C, Taieb D, Diouani MF, Ahmed SB, Chtourou Y, B'Chir BI, et al. Field trials of a very potent rabies DNA vaccine which induced long lasting virus neutralizing antibodies and protection in dogs in experimental conditions. *Vaccine* 2006; 24(8): 1063–72.
47. Стародубова ЕС, Кузьменко ЮВ, Латанова АА, Преображенская ОВ, Карпов ВЛ. Создание ДНК-вакцинного вектора на основе кодон-оптимизированного гена гликопротеина (белка G) вируса бешенства с консенсусной аминокислотной последовательностью. *Молекулярная биология* 2016; 50(2): 376–80.
48. Kaur M, Rai A, Bhatnagar R. Rabies DNA vaccine: no impact of MHC class I and class II targeting sequences on immune response and protection against lethal challenge. *Vaccine* 2009; 27(15): 2128–37.
49. Kaur M, Saxena A, Rai A, Bhatnagar R. Rabies DNA vaccine encoding lysosome-targeted glycoprotein supplemented with Emulsigen-D confers complete protection in preexposure and postexposure studies in BALB/c mice. *FASEB J.* 2010; 24(1): 173–83.
50. Kramps T, Probst J. Messenger RNA-based vaccines: progress, challenges, applications. *Wiley interdisciplinary reviews: RNA* 2013; 4(6): 737–49.
51. Schnee M, Vogel AB, Voss D, Petsch B, Baumhof P, Kramps T, et al. An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(6): e0004746.
52. Clinicaltrials.gov RActive® Rabies vaccine (CV7201) in Healthy Adults [Internet]. 2016 [cited 2016 August 12] Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02241135?term=rabies+vaccine&rank=39>.
53. Draper SJ, Heeney JL. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(1): 62–73.
54. Седова ЕС, Щербинин ДН, Мизунов АИ, Смирнов ЮА, Лозунов ДЮ, Шмаров ММ и др. Групповые рекомбинантные вакцины. *Acta naturae* 2012; 4(15): 17–27.
55. Wiktor TJ, Macfarlan RI, Reagan KJ, Dietzschold B, Curtis PJ, Wunner WH, et al. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81(22): 7194–8.
56. Follmann E, Ritter D, Swor R, Dunbar M, Hueffer K. Preliminary evaluation of Raboral V-RG® oral rabies vaccine in Arctic foxes (*Vulpes lagopus*). *J Wildl Dis.* 2011; 47(4): 1032–5.
57. Amann R, Rohde J, Wulle U, Conlee D, Raue R, Martinon O, et al. A new rabies vaccine based on a recombinant ORF virus (parapoxvirus) expressing the rabies virus glycoprotein. *J Virol.* 2013; 87(3): 1618–30.
58. Marrow JC, Padilla LR, Hayek LA, Bush M, Murray S. Comparison of antibody response to a nonadjuvanted, live canarypox-vectored recombinant rabies vaccine and a killed, adjuvanted rabies vaccine in eld's deer (*Rucervus eldi thamin*). *J Zoo Wildl Med.* 2014; 45(2): 315–20.
59. Li Z, Wang J, Yuan D, Wang S, Sun J, Yi B, et al. A recombinant canine distemper virus expressing a modified rabies virus glycoprotein induces immune responses in mice. *Virus Genes* 2015; 50(3): 434–41.
60. Yuan Z, Zhang S, Liu Y, Zhang F, Fooks AR, Li Q, et al. A recombinant pseudorabies virus expressing rabies virus glycoprotein: Safety and immunogenicity in dogs. *Vaccine* 2008; 26(10): 1314–21.
61. Huang Y, Chen Z, Huang J, Fu Z, He B. Parainfluenza virus 5 expressing the G protein of rabies virus protects mice after rabies virus infection. *J Virol.* 2015; 89(6): 3427–9.
62. Astray RM, Ventini DC, Boldorini VL, Silva FG, Rocca MP, Pereira CA. Rabies virus glycoprotein and immune response pattern using recombinant protein or recombinant RNA viral vectors. *Vaccine* 2014; 32(24): 2829–32.
63. Wu Q, Yu F, Xu J, Li Y, Chen H, Xiao S, et al. Rabies-virus-glycoprotein-pseudotyped recombinant baculovirus vaccine confers complete protection against lethal rabies virus challenge in a mouse model. *Vet Microbiol.* 2014; 171(1–2): 93–101.
64. Карпов АП, Тутыхина ИЛ, Лозунов ДЮ, Верховская ЛВ, Шмаров ММ, Валихов АФ и др. Конструирование рекомбинантных аденовирусов птиц CELo, экспрессирующих гены гликопротеинов gB, gE, gI вируса болезни Марека. *Биотехнология* 2007; (5): 38–44.
65. Тутыхина ИЛ, Щербинин ДН, Шмаров ММ, Лозунов ДЮ, Народицкий БС. Преимущества и перспективы использования генетических вакцин для защиты от опасных и социально значимых инфекций. *Вестник РАН* 2011; (10): 37–49.
66. Zhang S, Liu Y, Fooks AR, Zhang F, Hu R. Oral vaccination of dogs (*Canis familiaris*) with baits containing the recombinant rabies-canine adenovirus type-2 vaccine confers long-lasting immunity against rabies. *Vaccine* 2008; 26(3): 345–50.
67. Hu RL, Liu Y, Zhang SF, Zhang F, Fooks AR. Experimental immunization of cats with a recombinant rabies-canine adenovirus vaccine elicits a long-lasting neutralizing antibody response against rabies. *Vaccine* 2007; 25(29): 5301–7.
68. Zhao J, Liu Y, Zhang S, Fang L, Zhang F, Hu R. Experimental oral immunization of ferret badgers (*Melogale moschata*) with a recombinant canine adenovirus vaccine CAV-2-E3D-RGP and an attenuated rabies virus SRV9. *J Wildl Dis.* 2014; 50(2): 374–7.
69. Шмаров ММ, Тутыхина ИЛ, Лозунов ДЮ, Верховская ЛВ, Народицкий БС, Гинцбург АЛ. Индукция протективного иммунного ответа у мышей, вакцинированных рекомбинантным аденовирусом птиц CELo, экспрессирующим гликопротеин G вируса бешенства. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии* 2006; (4): 69–71.
70. Xiang ZQ, Greenberg L, Ertl HC, Rupprecht CE. Protection of non-human primates against rabies with an adenovirus recombinant vaccine. *Virology* 2014; 450–451: 243–9.
71. Tutykhina IL, Logunov DY, Shcherbinin DN, Shmarov MM, Tikhvatulin AI, Naroditsky BS, et al. Development of adenoviral vector-based mucosal vaccine against influenza. *J Mol Med (Berl).* 2011; 89(4): 331–41.
72. Yarosh OK, Wandeler AI, Graham FL, Campbell JB, Prevec L. Human adenovirus type 5 vectors expressing rabies glycoprotein. *Vaccine* 1996; 14(13): 1257–64.
73. Shen CF, Lanthier S, Jacob D, Montes J, Beath A, Beresford A, et al. Process optimization and scale-up for production of rabies vaccine live adenovirus vector (AdRG1.3). *Vaccine* 2012; 30(2): 300–6.
74. Lutze-Wallace C, Wandeler A, Prevec L, Sidhu M, Sapp T, Armstrong J. Characterization of a human adenovirus 5: rabies glycoprotein recombinant vaccine reisolated from orally vaccinated skunks. *Biologicals* 1995; 23(4): 271–7.

75. Knowles MK, Nadin-Davis SA, Sheen M, Rosatte R, Mueller R, Beresford A. Safety studies on an adenovirus recombinant vaccine for rabies (AdRG1.3-ONRAB®) in target and non-target species. *Vaccine* 2009; 27(47): 6619–26.
76. Knowles MK, Roberts D, Craig S, Sheen M, Nadin-Davis SA, Wandler AI. In vitro and in vivo genetic stability studies of a human adenovirus type 5 recombinant. *Vaccine* 2009; 27(20): 2662–8.
77. Rosatte RC, Donovan D, Davies JC, Brown L, Allan M, von Zuben V, et al. High-density baiting with ONRABH rabies vaccine Bait to control arctic-variant rabies in striped skunks in Ontario, Canada. *J Wildl Dis.* 2011; 47(2): 459–65.
78. Mainguy J, Rees EE, Canac-Marquis P, Bélanger D, Fehlner-Gardiner C, Séguin G, et al. Oral rabies vaccination of raccoons and striped skunks with ONRAB® baits: multiple factors influence field immunogenicity. *J Wildl Dis.* 2012; 48(4): 979–90.
79. Sobey KG, Walpole AA, Rosatte R, Fehlner-Gardiner C, Donovan D, Bachmann P, et al. An assessment of ONRAB® oral rabies vaccine persistence in free-ranging mammal populations in Ontario, Canada. *Vaccine* 2013; 31(17): 2207 – 13.
80. Slate D, Chipman RB, Algeo TP, Mills SA, Nelson KM, Croson CK, et al. Safety and immunogenicity of Ontario rabies vaccine bait (ONRAB) in the first us field trial in raccoons (*Procyon lotor*). *J Wildl Dis.* 2014; 50(3): 582–95.
81. Fry TL, Vandalen KK, Duncan C, Vercauteren K. The safety of ONRAB® in select non-target wildlife. *Vaccine* 2013; 31(37): 3839–42.
82. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Human contacts with oral rabies vaccine baits distributed for wildlife rabies management—Ohio, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013; 62(14): 267–9.
83. Gao GP, Yang Y, Wilson JM. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol.* 1996; 70(12): 8934–43.
84. Wang S, Sun C, Zhang S, Zhang X, Liu Y, Wang Y, et al. Glycoprotein from street rabies virus BD06 induces early and robust immune responses when expressed from a nonreplicative adenovirus recombinant. *Arch Virol.* 2015; 160(9): 2315–23.

Об авторах

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

Седова Елена Сергеевна. Научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, канд. биол. наук.

Шмаров Максим Михайлович. Руководитель лаборатории молекулярной биотехнологии, д-р биол. наук.

Адрес для переписки: Седова Елена Сергеевна; sedova-es@yandex.ru

New recombinant rabies vaccines

E. S. Sedova, M. M. Shmarov

Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N. F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The review covers problems of construction and production of new recombinant rabies vaccine. New approaches are being investigated to develop rabies vaccine and include methods of reverse genetic, production of virus antigens in plant cells cultures, obtaining of virus like particles and DNA and virus vector-based vaccines. Reverse genetics techniques let to manipulate the rabies genome and construct new attenuated strains of rabies virus. The production of the rabies virus main antigen (the glycoprotein G) in the plant cells cultures is promising for getting «edible» vaccines that do not require cleaning of antigen and repeated parenteral administration. Virus-like particles are capable to carry several rabies virus antigens, as well as different molecular adjuvants. DNA vaccines are characterized by ease preparation and low cost, but require different ways to enhance immunogenicity. Such approaches as DNA and virus vector-based vaccines delivering foreign genes, for example the gene of the glycoprotein G. Nowadays veterinary vaccines based on recombinant replication-competent vaccinia virus and human adenovirus type 5 are being actively used. Non-replicative human adenovirus type 5, expressing rabies glycoprotein G gene, is a good candidate for development of vaccines for mass immunization of the population.

Key words: recombinant vaccines; rabies virus; reverse genetic; plant cells cultures; virus-like particles; genetic vaccine.

For citation: Sedova ES, Shmarov MM. New recombinant rabies vaccines. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (4): 219–228.

References

1. Davis BM, Rall GF, Schnell MJ. Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). *Annu Rev Virol.* 2015; 2(1): 451–71.
2. World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies. Second Report. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2013; (982): 1–139.
3. Willoughby RE Jr. Rabies: rare human infection — common questions. *Infect Dis Clin North Am.* 2015; 29(4): 637–50.
4. Surveillance. About rabies situation in the Russian Federation [Internet] 2015 [cited 2016 Sept 12] Available from: http://rospotrebнадзор.ru/deyatelnost/epidemiological-surveillance/?ELEMENT_ID=5610&sphrase_id=731393 (in Russian).
5. Starodubova ES, Preobrazhenskaya JV, Kuzmenko YV, Latanova AA, Yarygina EI, Karpov VL. Rabies vaccines: current status and prospects for the development. *Molekulyarnaya biologiya* 2015; 49(4): 577–584 (in Russian).
6. Kaur M, Garg R, Singh S, Bhatnagar R. Rabies vaccines: where do we stand, where are we heading? *Expert Rev Vaccines.* 2015; 14(3): 369–81.
7. Rupprecht CE, Nagarajan T, Ertl H. Current status and development of vaccines and other biologics for human rabies prevention. *Expert Rev Vaccines.* 2016; 15(6): 731–49.
8. Hicks DJ, Fooks AR, Johnson N. Developments in rabies vaccines. *Clin Exp Immunol.* 2012; 169(3): 199–204.
9. Conzelmann KK, Schnell M. Rescue of synthetic genome RNA analogs of rabies virus by plasmid encoded proteins. *J Virol.* 1994; 68(2): 713–9.

10. Blanton JD, Self J, Niezgoda M, Faber ML, Dietzschold B, Rupprecht C. Oral vaccination of raccoons (*Procyon lotor*) with genetically modified rabies virus vaccines. *Vaccine* 2007; 25(42): 7296–300.
11. Tao L, Ge J, Wang X, Wen Z, Zhai H, Hua T, et al. Generation of a recombinant rabies Flury LEP virus carrying an additional G gene creates an improved seed virus for inactivated vaccine production. *Virology* 2011; 8: 454.
12. Liu X, Yang Y, Sun Z, Chen J, Ai J, Dun C et al. A recombinant rabies virus encoding two copies of the glycoprotein gene confers protection in dogs against a virulent challenge. *PLoS One* 2014; 9(2): e87105.
13. Safonov GA, Ban'kovsky DO. Evaluating antigenic and immunogenic properties of rabies virus strain ERA G333. *Vestnik Rossiiskoi sel'skhozhoiastvennoi nauki* 2010; (5): 61–3 (in Russian).
14. Yang DK, Nakagawa K, Ito N, Kim HH, Hyun BH, Nah JJ, et al. A single immunization with recombinant rabies virus (ERAG3G) confers complete protection against rabies in mice. *Clin Exp Vaccine Res.* 2014; 3(2): 176–84.
15. Shuai L, Feng N, Wang X, Ge J, Wen Z, Chen W, et al. Genetically modified rabies virus ERA strain is safe and induces long-lasting protective immune response in dogs after oral vaccination. *Antiviral Res.* 2015; 121: 9–15.
16. Cenna J, Hunter M, Tan GS, Papaneri AB, Ribka EP, Schnell MJ, et al. Replication-deficient rabies virus-based vaccines are safe and immunogenic in mice and nonhuman primates. *J Infect Dis.* 2009; 200(8): 1251–60.
17. Zhao L, Toriumi H, Wang H, Kuang Y, Guo X, Morimoto K, et al. Expression of MIP-1 α (CCL3) by a recombinant rabies virus enhances its immunogenicity by inducing innate immunity and recruiting dendritic cells and B cells. *J Virol.* 2010; 84(18): 9642–8.
18. Wen Y, Wang H, Wu H, Yang F, Tripp RA, Hogan RJ, et al. Rabies virus expressing dendritic cell-activating molecules enhances the innate and adaptive immune response to vaccination. *J Virol.* 2011; 85(4): 1634–44.
19. Barkhouse DA, Garcia SA, Bongiorno EK, Lebrun A, Faber M, Hooper DC. Expression of interferon gamma by a recombinant rabies virus strongly attenuates the pathogenicity of the virus via induction of type I interferon. *J Virol.* 2015; 89(1): 312–22.
20. Norton JE, Lytle AG, Shen S, Tzvetkov EP, Dorfmeier CL, McGettigan JP. ICAM-1-based rabies virus vaccine shows increased infection and activation of primary murine B cells in vitro and enhanced antibody titers in-vivo. *PLoS One* 2014; 9(1): e87098.
21. Rosales-Mendoza S. Current developments and future prospects for plant-made biopharmaceuticals against rabies. *Mol Biotechnol.* 2015; 57(10): 869–79.
22. McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, et al. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology* 1995; 13(13): 1484–7.
23. Ashraf S, Singh PK, Yadav DK, Shah Nawaz M, Mishra S, Sawant SV, et al. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *J Biotechnol.* 2005; 119(1): 1–14.
24. Loza-Rubio E, Rojas-Anaya E, Lypez J, Olivera-Flores MT, Gómez-Lim M, Tapia-Pérez G. Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein. *Vaccine* 2012; 30(37): 5551–6.
25. Rojas-Anaya E, Loza-Rubio E, Olivera-Flores MT, Gymez-Lim M. Expression of rabies virus G protein in carrots (*Daucus carota*). *Transgenic Res.* 2009; 18(6): 911–9.
26. Roy S, Tyagi A, Tiwari S, Singh A, Sawant SV, Singh PK, et al. Rabies glycoprotein fused with B subunit of cholera toxin expressed in tobacco plants folds into biologically active pentameric protein. *Protein Expr Purif.* 2010; 70(2): 184–90.
27. Skarjinska M, Ruby K, Araujo A, Taylor K, Gopalasamy-Raju V, Musiyuchuk K, et al. Hair roots as a vaccine production and delivery system. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013; 134: 115–34.
28. Singh A, Srivastava S, Chouksey A, Panwar BS, Verma PC, Roy S, et al. Expression of rabies glycoprotein and ricin toxin B chain (RGP-RTB) fusion protein in tomato hairy roots: A step towards oral vaccination for rabies. *Mol Biotechnol.* 2015; 57(4): 359–70.
29. Perea Arango I, Loza Rubio E, Rojas Anaya E, Olivera Flores T, Gonzalez de la Vara L, Gymez Lim MA. Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high levels and evaluation of immune responses in mice. *Plant Cell Reports* 2008; 27(4): 677–85.
30. Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu ZF, Steplewski K, Hooper DC, et al. Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(5): 2481–5.
31. Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleysh N, Kean RB, Mikheeva T, et al. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 2002; 20(25–26): 3155–64.
32. Lua LHL, Connors NK, Sainsbury F, Chuan YP, Wibowo N, Middelberg APJ. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol Bioeng.* 2014; 111(3): 425–40.
33. Hua RH, Li YN, Chen ZS, Liu LK, Huo H, Wang XL, et al. Generation and characterization of a new mammalian cell line continuously expressing virus-like particles of Japanese encephalitis virus for a subunit vaccine candidate. *BMC Biotechnol.* 2014; 14: 62.
34. Fontana D, Kratje R, Etcheverrigaray M, Prieto C. Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. *Vaccine* 2015; 33(35): 4238–46.
35. Kang H, Qi Y, Wang H, Zheng X, Gao Y, Li N, et al. Virus-like particles containing membrane-anchored GM-CSF enhances the immune response against rabies virus. *Viruses* 2015; 7(3): 1134–52.
36. Qi Y, Kang H, Zheng X, Wang H, Gao Y, Yang S, et al. Incorporation of membrane-anchored flagellin or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit enhances the immunogenicity of rabies virus-like particles in mice and dogs. *Front Microbiol.* 2015; 6: 169.
37. Abdulhaqq SA, Weiner DB. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunol Res.* 2008; 42(1–3): 219–32.
38. Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J, Ertl HC. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 1994; 199(1): 132–40.
39. Perrin P, Jacob Y, Aguilar-Sertien A, Loza-Rubio E, Jallet C, Desmúzières E, et al. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* 1999; 18(5–6): 479–86.
40. Lodmell DL, Ray NB, Parnell MJ, Ewalt LC, Hanlon CA, Shaddock JH, et al. DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. *Nat Med.* 1998; 4(8): 949–52.
41. Margalith M, Vilalta A. Sustained protective rabies neutralizing antibody titers after administration of cationic lipid-formulated pDNA vaccine. *Genet Vaccines Ther.* 2006; 4: 2.
42. Lodmell DL, Ray NB, Ulrich JT, Ewalt LC. DNA vaccination of mice against rabies virus: effects of the route of vaccination and the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL). *Vaccine* 2000; 18(11–12): 1059–66.
43. Pinto AR, Reyes-Sandoval A, Ertl HCJ. Chemokines and TRANCE as genetic adjuvants for a DNA vaccine to rabies virus. *Cell Immunol.* 2003; 224(2): 106.
44. Lodmell DL, Parnell MJ, Bailey JR, Ewalt LC, Hanlon CA. Rabies DNA vaccination of non-human primates: post-exposure studies using gene gun methodology that accelerates induction of neutralizing antibody and enhances neutralizing antibody titers. *Vaccine* 2002; 20(17–18): 2221–8.
45. Borhani K, Ajorloo M, Bamdad T, Mozghani SH, Ghaderi M, Gholami AR. A comparative approach between heterologous prime-boost vaccination strategy and DNA vaccinations for rabies. *Arch Iran Med.* 2015; 18(4): 223–7.
46. Bahloul C, Taieb D, Diouani MF, Ahmed SB, Chtourou Y, B'Chir BI, et al. Field trials of a very potent rabies DNA vaccine which induced long lasting virus neutralizing antibodies and protection in dogs in experimental conditions. *Vaccine* 2006; 24(8): 1063–72.
47. Starodubova ES, Kuzmenko YuV, Latanova AA, Preobrazhenskaya OV, Karpov VL. Construction of a DNA vaccine vector based on a codon-optimized gene of rabies virus glycoprotein (G protein) with consensus amino acid sequence. *Mol Biol.* 2016; 50(2): 376–80 (in Russian).
48. Kaur M, Rai A, Bhatnagar R. Rabies DNA vaccine: no impact of MHC class I and class II targeting sequences on immune response and protection against lethal challenge. *Vaccine* 2009; 27(15): 2128–37.
49. Kaur M, Saxena A, Rai A, Bhatnagar R. Rabies DNA vaccine encoding lysosome-targeted glycoprotein supplemented with Emulsigen-D confers complete protection in preexposure and postexposure studies in BALB/c mice. *FASEB J.* 2010; 24(1): 173–83.
50. Kramps T, Probst J. Messenger RNA-based vaccines: progress, challenges, applications. *Wiley interdisciplinary reviews: RNA* 2013; 4(6): 737–49.

51. Schnee M, Vogel AB, Voss D, Petsch B, Baumhof P, Kramps T, et al. An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(6): e0004746.
52. Clinicaltrials.gov RActive® Rabies vaccine (CV7201) in Healthy Adults [Internet]. 2016 [cited 2016 August 12] Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02241135?term=rabies+vaccine&rank=39>.
53. Draper SJ, Heeney JL. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(1): 62–73.
54. Sedova ES, Shcherbinin DN, Migunov AI, Smirnov IA, Logunov DY, Shmarov MM, et al. Influenza recombinant vaccines. *Acta naturae* 2012; 4(15): 17–27 (in Russian).
55. Wiktor TJ, Macfarlan RI, Reagan KJ, Dietzschold B, Curtis PJ, Wunner WH, et al. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81(22): 7194–8.
56. Follmann E, Ritter D, Swor R, Dunbar M, Hueffer K. Preliminary evaluation of Raboral V-RG® oral rabies vaccine in Arctic foxes (*Vulpes lagopus*). *J Wildl Dis*. 2011; 47(4): 1032–5.
57. Amann R, Rohde J, Wulle U, Conlee D, Raue R, Martinon O, et al. A new rabies vaccine based on a recombinant ORF virus (parapoxvirus) expressing the rabies virus glycoprotein. *J Virol*. 2013; 87: 1618–30.
58. Marrow JC, Padilla LR, Hayek LA, Bush M, Murray S. Comparison of antibody response to a nonadjuvanted, live canarypox-vectored recombinant rabies vaccine and a killed, adjuvanted rabies vaccine in eld's deer (*Rucervus eldi thamin*). *J Zoo Wildl Med*. 2014; 45(2): 315–20.
59. Li Z, Wang J, Yuan D, Wang S, Sun J, Yi B, et al. A recombinant canine distemper virus expressing a modified rabies virus glycoprotein induces immune responses in mice. *Virus Genes* 2015; 50(3): 434–41.
60. Yuan Z, Zhang S, Liu Y, Zhang F, Fooks AR, Li Q, et al. A recombinant pseudorabies virus expressing rabies virus glycoprotein: Safety and immunogenicity in dogs. *Vaccine* 2008; 26(10): 1314–21.
61. Huang Y, Chen Z, Huang J, Fu Z, He B. Parainfluenza virus 5 expressing the G protein of rabies virus protects mice after rabies virus infection. *J Virol*. 2015; 89(6): 3427–9.
62. Astray RM, Ventini DC, Boldorini VL, Silva FG, Rocca MP, Pereira CA. Rabies virus glycoprotein and immune response pattern using recombinant protein or recombinant RNA viral vectors. *Vaccine* 2014; 32(24): 2829–32.
63. Wu Q, Yu F, Xu J, Li Y, Chen H, Xiao S, et al. Rabies-virus-glycoprotein-pseudotyped recombinant baculovirus vaccine confers complete protection against lethal rabies virus challenge in a mouse model. *Vet Microbiol*. 2014; 171(1–2): 93–101.
64. Karpov AP, Tutykhina IL, Logunov DY, Verkhovskaya LV, Shmarov MM, Valikhov AF, et al. Construction of recombinant avian adenoviruses CELO that express MDV glycoproteins gB, gE and gI. *Biotechnology in Russia* 2007; (5): 46–55 (in Russian).
65. Tutykhina IL, Shcherbinin DN, Shmarov MM, Logunov DY, Naroditsky BS. Advantages and prospects of the use of genetic vaccines for the protection from dangerous and socially significant infections. *Vestnik RAMN* 2011; (10): 37–49 (in Russian).
66. Zhang S, Liu Y, Fooks AR, Zhang F, Hu R. Oral vaccination of dogs (*Canis familiaris*) with baits containing the recombinant rabies-canine adenovirus type-2 vaccine confers long-lasting immunity against rabies. *Vaccine* 2008; 26(3): 345–50.
67. Hu RL, Liu Y, Zhang SF, Zhang F, Fooks AR. Experimental immunization of cats with a recombinant rabies-canine adenovirus vaccine elicits a long-lasting neutralizing antibody response against rabies. *Vaccine* 2007; 25(29): 5301–7.
68. Zhao J, Liu Y, Zhang S, Fang L, Zhang F, Hu R. Experimental Oral immunization of ferret badgers (*Melogale moschata*) with a recombinant canine adenovirus vaccine CAV-2-E3D-RGP and an attenuated rabies virus SRV9. *J Wildl Dis*. 2014; 50(2): 374–7.
69. Shmarov MM, Tutykhina IL, Logunov DY, Verkhovskaya LV, Nedosekov VV, Cybanov SZ. The induction of protective immune response in mice vaccinated by recombinant avian adenovirus CELO expressing glycoprotein G of the rabies virus. *Jurnal mikrobiologii, epidemiologii i immynobiologii* 2006; (4): 69–71 (in Russian).
70. Xiang ZQ, Greenberg L, Ertl HC, Rupprecht CE. Protection of non-human primates against rabies with an adenovirus recombinant vaccine. *Virology* 2014; 450–451: 243–9.
71. Tutykhina IL, Logunov DY, Shcherbinin DN, Shmarov MM, Tikhvatulin AI, Naroditsky BS, et al. Development of adenoviral vector-based mucosal vaccine against influenza. *J Mol Med (Berl)*. 2011; 89(4): 331–41.
72. Yarosh OK, Wandeler AI, Graham FL, Campbell JB, Prevec L. Human adenovirus type 5 vectors expressing rabies glycoprotein. *Vaccine* 1996; 14(13): 1257–64.
73. Shen CF, Lanthier S, Jacob D, Montes J, Beath A, Beresford A, et al. Process optimization and scale-up for production of rabies vaccine live adenovirus vector (AdRG1.3). *Vaccine* 2012; 30(2): 300–6.
74. Lutze-Wallace C, Wandeler A, Prevec L, Sidhu M, Sapp T, Armstrong J. Characterization of a human adenovirus 5: rabies glycoprotein recombinant vaccine reisolated from orally vaccinated skunks. *Biologicals* 1995; 23(4): 271–7.
75. Knowles MK, Nadin-Davis SA, Sheen M, Rosatte R, Mueller R, Beresford A. Safety studies on an adenovirus recombinant vaccine for rabies (AdRG1.3-ONRAB®) in target and non-target species. *Vaccine* 2009; 27(47): 6619–26.
76. Knowles MK, Roberts D, Craig S, Sheen M, Nadin-Davis SA, Wandeler AI. In vitro and in vivo genetic stability studies of a human adenovirus type 5 recombinant. *Vaccine* 2009; 27(20): 2662–8.
77. Rosatte RC, Donovan D, Davies JC, Brown L, Allan M, von Zuben V, et al. High-density baiting with ONRABH rabies vaccine Baits to control arctic-variant rabies in striped skunks in Ontario, Canada. *J Wildl Dis*. 2011; 47(2): 459–65.
78. Mainguy J, Rees EE, Canac-Marquis P, Bélanger D, Fehlner-Gardiner C, Séguin G, et al. Oral rabies vaccination of raccoons and striped skunks with ONRAB® baits: multiple factors influence field immunogenicity. *J Wildl Dis*. 2012; 48(4): 979–90.
79. Sobey KG, Walpole AA, Rosatte R, Fehlner-Gardiner C, Donovan D, Bachmann P, et al. An assessment of ONRAB® oral rabies vaccine persistence in free-ranging mammal populations in Ontario, Canada. *Vaccine* 2013; 31(17): 2207–13.
80. Slate D, Chipman RB, Algeo TP, Mills SA, Nelson KM, Croson CK, et al. Safety and immunogenicity of Ontario rabies vaccine bait (ONRAB) in the first us field trial in raccoons (*Procyon lotor*). *J Wildl Dis*. 2014; 50(3): 582–95.
81. Fry TL, Vandalen KK, Duncan C, Vercauteren K. The safety of ONRAB® in select non-target wildlife. *Vaccine* 2013; 31(37): 3839–42.
82. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Human Contacts with Oral Rabies Vaccine Baits Distributed for Wildlife Rabies Management—Ohio, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013; 62(14): 267–9.
83. Gao GP, Yang Y, Wilson JM. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol*. 1996; 70(12): 8934–43.
84. Wang S, Sun C, Zhang S, Zhang X, Liu Y, Wang Y, et al. Glycoprotein from street rabies virus BD06 induces early and robust immune responses when expressed from a nonreplicative adenovirus recombinant. *Arch Virol*. 2015; 160(9): 2315–23.

Authors

Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N. F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Gamalei street 18, Moscow 123098, Russian Federation.

Sedova ES. Researcher of the Laboratory of Molecular Biotechnology. Candidate of Biological Sciences.

Shmarov MM. Head of the Laboratory of Molecular Biotechnology. Doctor of Biological Sciences.

Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств

Р. А. Волкова, О. В. Фадейкина, В. И. Климов, Е. И. Саканян, Ю. В. Олефир, В. А. Меркулов,
А. А. Мовсисянц, В. П. Бондарев, И. В. Борисевич, Д. В. Шведов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 04.10.2016 г. Принята к публикации 17.11.2016 г.

При производстве и контроле качества лекарственных средств, в том числе биологических, применяют фармакопейные методы анализа с использованием стандартных образцов (СО), которые в настоящее время следует называть фармакопейными. Введение данного термина отражает особенности ЛС, контроль качества которых регламентируется не ГОСТами, а Государственной фармакопеей. Особенности лекарственных средств, соответственно и СО ЛС, требуют создания собственной нормативно-методической базы. Рекомендации, изложенные в документах ИСО РЕМКО, носят общий характер и не в полной мере учитывают особенности аттестации стандартных образцов для каждой конкретной области. Документы Росстандарта по государственным стандартам образцам не могут быть использованы для биологических лекарственных средств из-за их специфики, поскольку методы испытаний последних не позволяют разделить систематическую и случайную составляющие неопределенности результатов испытаний, как требуют документы Росстандарта. Нормативная база для биологических СО должна разрабатываться на основе рекомендаций ВОЗ и ИСН. Предложена классификация стандартных образцов лекарственных средств и перечень первоочередных документов, необходимых для разработки нормативно-методической базы, регламентирующей их разработку, аттестацию, утверждение и применение. В качестве примера разработки одного из документов данной системы приведена новая структура паспорта на стандартный образец.

Ключевые слова: стандартный образец; биологические лекарственные средства; нормативно-методические документы; классификация стандартных образцов; паспорт стандартного образца.

Библиографическое описание: Волкова РА, Фадейкина ОВ, Климов ВИ, Саканян ЕИ, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Мовсисянц АА, Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Шведов ДВ. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (4): 229–236.

В Российской Федерации в системе обеспечения единства измерений существует ряд подзаконных актов и нормативно-методических документов, определяющих порядок работ по созданию и аттестации государственных стандартных образцов.

При производстве и контроле качества лекарственных средств, в том числе биологических, применяют фармакопейные методы анализа с использованием стандартных образцов (СО), которые в настоящее время следует называть фармакопейными [1, 2] (ранее данные СО назывались государственными стандартными образцами для фармацевтических препаратов или отраслевыми стандартными образцами (ОСО) для медицинских иммунобиологических препаратов). Введение данного термина отражает особенности ЛС, контроль качества которых регламентируется не ГОСТами, а Государственной фармакопеей. Особенности лекарственных средств (ЛС), соответственно и СО ЛС, требуют создания собственной нормативно-методической базы.

Основные положения о СО лекарственных средств содержатся во всех изученных источниках в виде общего раздела или монографии (общей фармакопейной статьи — ОФС) [2–12], однако информация о требованиях к качеству, порядку разработки и аттестации данных стандартных образцов отсутствует. Порядок аттестации СО изложен в документах Росстандарта, имеющего большой опыт разработки и аттестации государственных СО [13–17], но указанные документы не могут быть использованы из-за спе-

цифики лекарственных средств, прежде всего — биологических, поскольку методы испытаний биологических лекарственных средств не позволяют разделить систематическую и случайную составляющие неопределенности результатов испытаний [18, 19], что необходимо в документах Росстандарта.

Целью настоящего обзора является изложение основных подходов для создания службы биологических стандартных образцов в области обращения лекарственных средств, гармонизированных с международными рекомендациями с учетом отечественной нормативной базы по СО.

Задача работы — разработка предложения по классификации СО лекарственных средств и перечня первоочередных нормативно-методических документов для функционирования этой службы, с приведением примера новой структуры паспорта на стандартный образец.

Как указывалось ранее, классификация СО ЛС может быть проведена на различной основе: по статусу, по уровню признания, по природе материала, по назначению [2, 20]. Анализ документов и опыт аттестации СО иммунобиологических препаратов позволил сделать вывод, что классификацию СО ЛС целесообразно проводить с точки зрения иерархии СО, т.е., по уровню признания, в России — это категория СО: международный СО, межгосударственный СО, фармакопейный СО (ранее государственный или отраслевой СО), стандартный образец предприятия.

– **Международный стандартный образец (МСО).**

Первичный СО. Для биологических МСО — прежде всего стандартные образцы активности, которую выражают, как правило, в условных Международных Единицах (МЕ), и которые утверждаются специальной комиссией экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [21].

– **Межгосударственный или региональный стандартный образец** — стандартный образец, признанный в соответствии с установленными правилами и применяемый в определенных областях стран, присоединившихся к его признанию, например стандартные образцы Европейской фармакопеи.

– **Государственный стандартный образец (ГСО)** — в России, Белоруссии и Казахстане это стандартный образец, признанный национальным органом по стандартизации, метрологии и сертификации в соответствии с законом об обеспечении единства измерений, применяемый во всех видах деятельности, находящихся в ведении федеральных органов власти. Они называются *стандартными образцами утвержденного типа*. До 1991 г. существовали государственные стандартные образцы фармацевтических лекарственных средств, нормативным документом на которые являлась фармакопейная статья, несмотря на то, что фармакопейные статьи оформлялись только на лекарственные средства. В соответствии с № 61-ФЗ [1] данные СО следует называть фармакопейными.

– **Отраслевой стандартный образец (ОСО)** — в России стандартный образец, признанный (утвержденный) органом, наделенным соответствующими полномочиями от федерального органа исполнительной власти, применяемый на предприятиях и в организациях в определенной сфере. Термин применялся для стандартных образцов, использующихся при контроле иммунобиологических, биотехнологических препаратов и препаратов крови человека. В соответствии с № 61-ФЗ [1] данные СО следует называть фармакопейными.

– **Стандартный образец предприятия (организации) или рабочий стандартный образец** — стандартный образец, утвержденный руководителем предприятия (организации) в установленном порядке и применяемый в соответствии с нормативными документами предприятия (организации). Поскольку в области обращения лекарственных средств данная категория СО широко используется, вопросы их разработки, аттестации, утверждения и применения также должны регулироваться нормативно-методической базой по СО ЛС.

В иерархии СО ЛС в каждой категории стандартных образцов могут быть выделены различные группы: первичные или вторичные СО. За рубежом — сертифицированные (certified reference material, CRM) или несертифицированные (reference material, RM) СО, как мера сравнения или для внутрилабораторного контроля качества (стандартные образцы, которые используются для оценки пригодности системы или стабильности аналитической работы), а также в зависимости от природы действующего вещества (табл. 1).

В зависимости от наличия или отсутствия Международного стандартного образца перечисленные СО (межгосударственные/региональные, государственные, отраслевые или фармакопейные стандартные образцы, стандартные образцы предприятия) могут быть первичными или вторичными. При отсутствии МСО первичными СО могут стать межгосударственные (региональные) или национальные (в России — государственные) фармакопейные и, наконец, в случае отсутствия всех перечисленных видов

СО, как это часто бывает для биологических лекарственных средств — стандартные образцы предприятия.

При оценке показателей качества (характеристик) стандартных образцов рекомендовано учитывать требования к ним, которые определены в системе документов ИСО РЕМКО: ISO Guide 30–35 [22–26], принятых в России как аутентичные переводы [14, 17, 27, 28]. Однако международные рекомендации, изложенные в документах ИСО РЕМКО, носят общий характер и не в полной мере учитывают особенности аттестации стандартных образцов для каждой конкретной области.

В области обращения лекарственных средств в основу отечественной нормативной базы для биологических СО должны быть положены рекомендации ВОЗ. В 2004 г. ВОЗ опубликованы основные характеристики и принципы изготовления биологических МСО, применяемых при экспертизе качества биологических препаратов [21]. Рекомендации по изготовлению биологических МСО ВОЗ касаются технологии производства стандартных образцов: оборудования, средств измерения для испытаний, однородности материала, качества стекла ампул и флаконов, используемых консервантов и наполнителей, процесса лиофилизации и запайки ампул.

В документе ВОЗ 2011 г. рассмотрены вопросы установления прослеживаемости и неопределенности значений аттестованных характеристик при процедуре аттестации вторичных стандартных образцов вакцин, а также других биологических препаратов [29].

Биологические МСО ВОЗ, будучи первичными стандартными образцами, являются наивысшими в иерархии стандартных образцов лекарственных средств, т.е. установленное значение их аттестуемых характеристик (выражено в МЕ — условных международных единицах) определяется активностью этого материала и не прослеживаемо к эталонному стандартному образцу более высокого уровня. Значение аттестованной характеристики биологических МСО ВОЗ может быть приведено без указания неопределенности. При разработке вторичных стандартных образцов (межгосударственных/отраслевых/фармакопейных, стандартных образцов предприятия) ВОЗ регламентирует обязательное установление прослеживаемости, в процессе которого присваивается единица измерения используемого биологического МСО при его наличии и проводится оценка неопределенности.

При установлении значения аттестуемой характеристики рекомендовано использовать количественные физико-химические, иммунохимические или биологические методы испытаний, приведенные в фармакопейной статье на соответствующую фармацевтическую субстанцию или лекарственный препарат.

Биологические МСО ВОЗ широко применяют для стандартизации и контроля широкого спектра биологических препаратов с использованием биологических, иммунохимических и физико-химических методов в целях обеспечения эффективности, качества и безопасности медицинских биологических лекарственных средств, используемых для профилактики, диагностики и лечения заболеваний человека.

Поскольку ни один биологический МСО или референтный материал (реагент) не существуют в количестве, достаточном для рутинного лабораторного контроля, ВОЗ рекомендует использовать биологические МСО для установления значений аттестуемых характеристик стандартных образцов для каждой конкретной страны, т.е. вторичных СО [21], что обеспечивает прослеживаемость атте-

стuemых величин до величин, присвоенных первичным стандартам. Вторичный СО должен обладать характеристиками, аналогичными первичному СО, объем испытаний может быть меньше, чем при аттестации первичного.

При отсутствии МСО целесообразна разработка фармакопейного СО (стандартного образца, использующегося в соответствии с Государственной фармакопеей РФ), так как наличие фармакопейного СО обеспечит единый подход при оценке качества одноименных лекарственных средств. Кроме того, фармакопейные СО могут применяться для аттестации стандартных образцов предприятия (СОПр). Таким образом, фармакопейный СО становится первичным СО при отсутствии МСО. В связи с этим должен быть определен порядок аттестации фармакопейного СО при отсутствии соответствующего МСО, а также СОПр при отсутствии соответствующего МСО или фармакопейного СО. Использование фармакопейного СО и СОПр при производстве и контроле лекарственных средств экономически целесообразно.

Разработка нормативно-методической базы по СО в области обращения лекарственных средств — комплекс-

ная задача, требующая решения вопросов метрологического обеспечения не только СО, но и методик испытаний лекарственных средств. Необходима разработка нормативных документов по различным этапам разработки и утверждения СО. При этом на наш взгляд целесообразно продолжить работу по уточнению термина СО. Нами предложена следующая формулировка:

«Стандартные образцы в области обращения лекарственных средств (СО ЛС) или фармакопейные стандартные образцы (ФСО) — это стандартные образцы, представляющие собой вещества, смеси веществ или образцы лекарственных средств с установленными значениями аттестуемых характеристик или надлежащим образом охарактеризованные, утвержденные в установленном порядке, с которыми проводят сравнение лекарственных средств или которые используют при испытании лекарственных средств с применением физико-химических, иммунохимических и биологических методов в соответствии с Государственной фармакопеей РФ или нормативной документацией на лекарственное средство. Порядок утверждения, введения в действие и применения стандартных образцов

Таблица 1. Категории стандартных образцов в области обращения лекарственных средств и их взаимосвязь

Категории стандартных образцов лекарственных средств	Первичные ¹ / Вторичные ² (I/II)	Референсный материал ³ / сертифицированный референсный материал ⁴ (RM/CRM)	Возможное назначение	Природа материала стандартных образцов лекарственных средств
	I I или II I или II	RM или CRM	Мера сравнения Внутрилабораторный контроль качества	Фармацевтические (химические) Биологические Радиофармацевтические Из растительного сырья

Примечание. * Для аттестации СО лекарственных средств и при их использовании применяются иммунохимические, биологические или физико-химические методы испытаний, не являющиеся методиками измерений; СО для этих методик являются фармакопейными.

** В методиках, которые относятся к методикам измерений, разрабатываются и используются государственные СО; к ним относятся следующие методики: определение осмолярности, электропроводности, показателя преломления, а также методики, которые относятся к методикам измерений, в том случае, если не предусмотрена пробоподготовка:

- Определение pH
- Определение оптической плотности
- Определение степени окраски жидкости спектрофотометрическим методом
- Определение мутности жидкости турбидиметрическим методом
- Определение плотности
- Определение вязкости
- Определение удельного вращения

¹ **Первичный стандартный образец.** СО, обладающий необходимыми свойствами для целенаправленного использования, проверка пригодности которого осуществляется без сравнения с существующими СО [10, 20, 35].

² **Вторичный стандартный образец.** СО, аттестованный путем сравнения с первичным стандартным образцом [10, 21, 36].

³ **RM (reference material)** — материал или вещество, одно или несколько значений свойств которого достаточно однородны и установлены достаточно хорошо для того, чтобы использовать их для градуировки прибора, оценки метода измерения или приписывания значений [36].

⁴ **CRM (certified reference material)** — RM, к которому прилагается сертификат (свидетельство), одно или несколько значений свойств которого аттестованы процедурой, устанавливающей связь с реализацией единицы, в которой выражены значения свойства и для которой каждое аттестованное значение сопровождается неопределенностью на установленном доверительном уровне [36].

в области обращения лекарственных средств устанавливает Министерство здравоохранения Российской Федерации».

На основе данного определения, руководствуясь Федеральным законом от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ «Закон об обеспечении единства измерений» [30] и постановлением Правительства Российской Федерации от 02 ноября 2009 г. № 884 [31] нами предложена классификация СО (табл. 1). В соответствии с постановлением Правительства [31] ряду Министерств (Министерство здравоохранения Российской Федерации входит в их перечень) предоставлено право разработать свои требования к обеспечению единства для методик, не относящимся к методикам измерений и не подпадающих под действие № 102-ФЗ. Как видно из таблицы 1, классификация относится к СО для всех биологических, иммунохимических и физико-химических методов испытаний лекарственных средств, за исключением методов, приведенных в примечании. Для методов, указанных в примечании, должны разрабатываться государственные СО (стандартные образцы утвержденного типа). Остальные методы — это методы испытаний/контроля качества лекарственных средств в соответствии с фармакопейными статьями (ОФС и ФС) или нормативной документацией, стандартизация которых возложена на Министерство здравоохранения Российской Федерации (Государственная фармакопея Российской Федерации) и требует соответствующей нормативно-методической базы как для аттестации СО ЛС, так и для валидации методик испытаний. Разработка данной базы должна проводиться на основе руководств ВОЗ, рекомендаций ИСН и с учетом отечественной нормативно-методической базы для государственных стандартных образцов.

В Российской Федерации Росстандартом разработана система нормативно-методических документов, регламентирующая разработку, аттестацию, производство и применение государственных СО [13–17]. Создание СО включает следующие этапы:

- разработка технического задания (ТЗ), включающего проект программы и методики аттестации СО;
- проведение научно-исследовательских и экспериментальных работ по изготовлению и аттестации СО, включая исследование стабильности СО, на основании которых устанавливают значения аттестуемой характеристики СО и ее неопределенность;
- разработка технической или сопроводительной документации (паспорт, макеты этикеток, инструкция по применению СО), оформление отчета о разработке СО;
- экспертиза материалов по разработке СО;
- утверждение и регистрация СО.

Эти же этапы должны присутствовать при создании СО лекарственных средств, в том числе биологических, что требует разработки соответствующих методических документов.

Аттестация стандартного образца предусматривает установление значения аттестуемой характеристики стандартного образца и его неопределенности, оформление паспорта на СО. Аттестуемой характеристикой СО ИЛП может быть специфическая активность, титр или концентрация вирусов, бактерий, содержание активного компонента, вспомогательных веществ, примеси и др. Она должна быть представлена в виде среднего значения с указанием неопределенности. При разработке и аттестации СО должны быть показаны однородность и стабильность материала — кандидата в СО, установлен срок годности.

Неопределенность аттестованной характеристики СО связана с результатом испытания и характеризует диспер-

сию значений, которые обоснованно могли бы быть приписаны измеряемой величине. Для эмпирических методов, какими являются практически все методы испытаний биологических лекарственных средств, показана целесообразность оценки неопределенности методов испытаний биологических/иммунобиологических лекарственных средств по стандартному отклонению при оценке воспроизводимости методики [19, 35–38].

Результат разработки документов по биологическим СО можно продемонстрировать на примере разработки формы паспорта на СО (в настоящее время должен называться фармакопейным СО) для биологических лекарственных средств.

Основные требования к содержанию информации, приводимой в сопроводительной документации к стандартным образцам, в том числе к паспорту, в Руководстве ИСО 31:2000, и ГОСТ Р 8.691–2010 сходны (табл. 2).

В связи с необходимостью актуализации формы и содержания паспортов и этикеток для СО ЛС в соответствии с современными международными, российскими требованиями и учетом информации, приводимой в паспорте на Международный биологический стандартный образец ВОЗ, нами предложена новая структура паспорта на СО ЛС (табл. 2). Как следует из таблицы 2, с целью гармонизации с международными требованиями паспорт СО ЛС должен быть дополнен указанием стандартного образца (эталона, международного, регионального или фармакопейного стандартного образца), к которому он прослеживаем (раздел «Утверждение о прослеживаемости»). Кроме того, в паспорте СО ЛС следует использовать термин «неопределенность» вместо термина «погрешность». Эти требования введены и в структуру паспорта на ГСО.

Как видно из таблицы 2, нами использованы все позиции, рекомендованные международными документами, а также большая часть позиций, принятых в отечественной системе государственных стандартных образцов, за исключением позиций, связанных с положениями Государственной системы обеспечения единства измерений: термин «стандартные образцы утвержденного типа (ГСО)», знак утверждения типа стандартного образца, номер и срок действия свидетельства об утверждении типа стандартного образца. Исключен также способ определения метрологических характеристик стандартного образца, поскольку для их оценки должны использоваться специально разработанные подходы, учитывающие особенности биологических лекарственных средств.

В целом необходимо разработать комплект технических и методических документов, устанавливающих порядок создания и аттестации стандартных образцов ЛС, требования к отчету по результатам экспериментальных работ и оформлению сопроводительной документации для СО, процедуру проведения экспертизы материалов по СО. Первоочередной перечень документов по СО ЛС, необходимых для разработки, представлен ниже:

- Стандартные образцы лекарственных средств. Основные положения
- Порядок проведения аттестации стандартных образцов лекарственных средств
- Содержание отчета о разработке, аттестации, переаттестации (продлении срока годности) стандартных образцов лекарственных средств.
- Содержание паспортов и макетов этикеток стандартных образцов лекарственных средств.

- Порядок проведения экспертизы документации по разработке, аттестации/продлению срока годности СО лекарственных средств.
 - Порядок утверждения стандартных образцов лекарственных средств.
 - Порядок ведения Реестра стандартных образцов лекарственных средств.
- Проекты данных документов могут быть разработаны на основе стандартных операционных процедур ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России: общие положения о био-

Таблица 2. Структура паспорта на стандартный образец по ИСО, ГОСТ и предлагаемая структура паспорта стандартного образца биологических лекарственных средств

Структура паспорта (Руководство 31:2000 ИСО)	Структура паспорта (ГОСТ Р 8.691–2010)	Структура предлагаемого паспорта СО ЛС
Название и адрес аттестующего органа	Название и адрес организаций: разработчика и изготовителя	Название и адрес организации, проводившей аттестацию
Название документа	Название документа	Название документа
Название материала	Наименование стандартного образца	Наименование стандартного образца
Код стандартного образца и номер партии	Регистрационный номер типа, буквенно-цифровой код и номер партии (экземпляра) стандартного образца	Регистрационный номер (буквенно-цифровой код) и номер серии стандартного образца
Описание стандартного образца	Описание стандартного образца	* Информация совмещена с разделом «Дополнительные сведения»
Назначение	Назначение	Назначение
Инструкции по правильному использованию стандартного образца	Инструкция по применению	Порядок применения (указана ссылка на Инструкцию по применению СО, которая оформляется отдельным документом)
Безопасность	Требования безопасности	Требования безопасности
Уровень однородности	Неоднородность стандартного образца	* Информация размещена в разделе «Описание и дополнительные сведения»
Аттестованные значения и их неопределенности	Метрологические характеристики	Аттестованные характеристики
Прослеживаемость	Утверждение о прослеживаемости	Утверждение о прослеживаемости
Значения, полученные отдельными лабораториями или методами	Значения, полученные отдельными лабораториями или методами	(—)
Неаттестованные значения	*	* Информация размещена в разделе «Описание и дополнительные сведения»
Дата аттестации	Дата выпуска или последняя дата повторного определения метрологических характеристик экземпляра стандартного образца	Дата выпуска (дата последнего определения значений аттестованных характеристик экземпляра (серии) стандартного образца
Срок действия	Срок годности экземпляра или периодичность повторных определений метрологических характеристик стандартного образца	Срок годности (периодичность повторных определений значений аттестованных характеристик) экземпляра (серии) стандартного образца
Дополнительная информация	Дополнительные сведения	Дополнительные сведения: – описание стандартного образца; – методики (методы) измерений испытаний, примененные при установлении значений аттестованных характеристик стандартного образца
Фамилии и подписи аттестующих лиц	Фамилии и подписи ответственных лиц	Фамилии и подписи аттестующих лиц
(—)	Знак утверждения типа стандартного образца	(—)
(—)	Способ определения метрологических характеристик стандартного образца	(—)
(—)	Методики (методы) измерений, примененные при определении метрологических характеристик стандартного образца	* Информация размещена в разделе «Аттестованная характеристика» или «Дополнительные сведения»
(—)	Условия хранения и транспортирования	Условия хранения и транспортирования
(—)	Комплект поставки	Комплект поставки
(—)	Номер и срок действия свидетельства об утверждении типа стандартного образца	(—)

Примечание. (—) обозначает, что данный раздел отсутствует.

* Данный раздел исключен, так как его положения размещены в других разделах настоящего стандарта.

логических СО, порядок их аттестации, содержание паспортов и этикеток СО биологических ЛС, содержание и оформление отчета о разработке (аттестации) СО биологических ЛС, перечень стандартных образцов ИЦЭК МИБП, порядок установления срока годности при разработке и аттестации стандартных образцов, порядок утверждения СО биологических ЛС.

Таким образом, исходя из анализа действующих в Российской Федерации документов государственной системы измерений, международных рекомендаций и опыта аттестации биологических СО и СО ЛС предложена их классификация, а также перечень нормативно-методических документов, которые необходимы для функционирования службы СО лекарственных средств под юрисдикцией Министерства здравоохранения Российской Федерации. В качестве примера разработки одного из документов данной системы приведена новая структура паспорта на стандартный образец.

Литература

1. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
2. 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. *Химио-фармацевтический журнал* 2016; 50(4): 40–3.
3. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. Выпуск 2. М.: Медицина; 1990.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. 12-е изд. Часть 1. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения; 2008.
5. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 2. М.; 2015. Available from: <http://193.232.7.107/feml>.
6. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Минск: Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении; 2009.
7. Государственная фармакопея Украины. 1-е изд. Доп. 1–4. Харьков: Научно-экспертный фармакопейный центр; 2012.
8. Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 1. Астана: Жибек жолы; 2008.
9. *British Pharmacopoeia*, 2009. V. 1–4.
10. *European Pharmacopoeia*. 8th ed. Available from: <http://online.edqm.eu/entry.htm>.
11. *The International Pharmacopoeia (First and Second Supplements)*. 4th ed. 2011. Available from: <http://apps.who.int/phint/en/p/about/>.
12. *United States Pharmacopoeia*. 35th ed. Available from: <http://www.uspnf.com/uspnf/login>.
13. ГОСТ 8.315–97 ГСИ. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения. М.: Изд-во стандартов; 2004.
14. ГОСТ Р 8.753–2011 ГСИ. Стандартные образцы материалов (веществ). Основные положения. М.: Стандартинформ; 2013.
15. ГОСТ 8.532–2002 ГСИ. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Межлабораторная метрологическая аттестация. Содержание и порядок проведения работ. М.: Изд-во стандартов; 2003.
16. ГОСТ Р 8.563–2009 ГСИ. Методики (методы) измерений. М.: Стандартинформ; 2010.
17. ГОСТ Р 8.694–2010 (ISO Guide 35:2006, MOD) ГСИ. Стандартные образцы материалов (веществ). Общие и статистические принципы определения метрологических характеристик стандартных образцов. М.: Стандартинформ; 2012.
18. Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения* 2013; (2): 28–32.
19. Волкова РА. Методики контроля или методики испытаний — к вопросу о метрологическом обеспечении аналитических методик. *Справочник заведующего КДЛ* 2013; (4): 4–9.
20. Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Климов ВИ, Шемерякина ТБ, Яшкир ВА, Бармин АВ. Современные подходы к разработке стандартных образцов для оценки качества фармацевтических субстанций. *Химио-фармацевтический журнал* 2015; 49(11): 54–6.
21. WHO Expert Committee on biological standardization. *Recommendations for the preparation and establishment of international and other biological reference standards*. Technical Reports Series № 932. Annex 2. Geneva: WHO; 2004. P. 73–131, 137.
22. ISO Guide 30:1992. Terms and definitions used in connection with reference material [cited 2016 Mar 14]. Available from: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=21638.
23. ISO Guide 31:2001 (Released: 31:2015) Reference material — Content of certificates and labels [cited 2016 Mar 14]. Available from: <http://www.en-standard.eu/iso-guide-31-reference-materials-contents-of-certificates-and-labels/>.
24. ISO Guide 33:2002. Uses of certified reference materials [cited 2016 Mar 14]. Available from: <http://www.en-standard.eu/iso-guide-33-uses-of-certified-reference-materials/>.
25. ISO Guide 34:2009. General requirements for the competence of reference material producers [cited 2016 Oct 31]. Available from: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=50174.
26. ISO Guide 35:2006 Reference Material — General and statistical principles for certification [cited 2015 Mar 14]. Available from: <http://www.en-standard.eu/iso-guide-35-reference-materials-general-and-statistical-principles-for-certification/>.
27. ГОСТ Р 8.691–2010 (ISO Guide 31:2000, MOD) ГСИ. Стандартные образцы материалов (веществ). Общие требования к паспортам и этикеткам. М.: Стандартинформ; 2012.
28. ГОСТ Р 8.824–2013 (ISO Guide 34:2009, IDT). Общие требования к компетентности изготовителей стандартных образцов. М.: Стандартинформ; 2014.
29. WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines. WHO/IVB/11/03. June 2011.
30. Федеральный закон от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».
31. Постановление Правительства Российской Федерации от 2 ноября 2009 г. № 884. Положение о Государственной службе стандартных образцов состава и свойств веществ и материалов.
32. ГОСТ РМГ 93–2009 ГСИ. Оценивание метрологических характеристик стандартных образцов. М.: Стандартинформ; 2009.
33. ГОСТ Р 50.2.058–2007 ГСИ. Оценивание неопределенности аттестованных значений стандартных образцов. М.: Стандартинформ; 2008.
34. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. СПб: ВНИИМ им. Д. И. Менделеева; 2002.
35. Международный словарь по метрологии: основные и общие понятия и соответствующие термины. СПб: Проффессионал; 2010.
36. *International Vocabulary of Metrology — Basic and general concept and associated terms (VIM)*. Guide JCGM 200:2008 [cited 2016 Mar 14]. Available from: https://iupac.org/publications/ci/2008/3006/bw2_vim.html.
37. Волкова РА. Система контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов химическими и иммунохимическими методами: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.; 2009.
38. Волкова РА. Проблемы метрологического обеспечения методики оценки качества иммунобиологических препаратов. В кн.: I Международная конференция «Стандартные образцы в измерениях и технологиях». Сборник трудов. Ч. 1. Екатеринбург; 2013. С. 88–90.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.
Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р биол. наук.

Фадеекина Ольга Васильевна. Главный технолог Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.
 Климов Владимир Иванович. Заместитель директора Центра планирования и координации НИР, канд. мед. наук.
 Саканян Елена Ивановна. Директор Центра фармакопей и международного сотрудничества, д-р фарм. наук, профессор.
 Мовсесянц Арташес Авакович. Начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р мед. наук, профессор.
 Олэфир Юрий Витальевич. Генеральный директор, д-р мед. наук.
 Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, профессор.
 Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.
 Борисевич Игорь Владимирович. Директор Центра планирования и координации НИР, д-р мед. наук, профессор.
 Шведов Дмитрий Владимирович. Заместитель начальника Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Адрес для переписки: Волкова Пауза Асхатовна; volkova@expmed.ru

Topical issues related to reference standards in the sphere of circulation of biological products

R. A. Volkova, O. V. Fadeikina, V. I. Klimov, E. I. Sakanyan, Yu. V. Olefir, V. A. Merkulov, A. A. Movsesyants, V. P. Bondarev, I. V. Borisevich, D. V. Shvedov

Federal State Budgetary Institution
 «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
 of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Pharmacopoeial analytical methods involving reference standards (RS) are used for manufacture and quality control of medicinal products, including biologicals, these RS should now be called pharmacopoeal. The introduction of the mentioned term reflects special drug characteristics, which are regulated not by the State Union Standards but by the Russian State Pharmacopoeia in terms of quality control. Drug and RS special characteristics require the establishment of legal and methodological framework. The recommendations stated in ISO REMCO are general do not fully cover the special aspects of the certification of reference standards for each specific area. The documents of the Federal Agency for Technical Regulating and Metrology (Rosstandart) on reference standards can not be used for biological medicinal products due to their specificity as the test methods do not allow to separate systematic and random components of uncertainty of test results, as required by Rosstandart. The regulatory framework for biological RS should be developed on the basis of WHO and ICH Guidelines. The classification of drug reference standards and the list of priority documents required for the elaboration of normative and procedural framework regulating their development, certification, approval and use is considered in the article. The development of the documents for the mentioned system is exemplified by a new pattern for an RS certificate.

Key words: reference standard; biological products; normative and procedural documents; classification of reference standards; certificate of a reference standard.

For citation: Volkova RA, Fadeikina OV, Klimov VI, Sakanyan EI, Olefir YuV, Merkulov VA, Movsesyants AA, Bondarev VP, Borisevich IV, Shvedov DV. Topical issues related to reference standards in the sphere of circulation of biological products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (4): 229–236.

References

1. Federal Law of the Russian Federation, April 12, 2010, № 61-FZ «On Circulation of Medicines» (in Russian).
2. Merkulov VA, Sakanyan EI, Volkova RA, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkir VA. Pharmacopoeial reference standards and their implementation in the national system of standardization of medicines. *Himiko-farmatsevticheskiy zhurnal* 2016; 50(4): 40–3 (in Russian).
3. The State Pharmacopoeia of the USSR. 11th ed. Issue 2. Moscow: Meditsina; 1990 (in Russian).
4. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 12th ed. Part 1. Moscow: NCESMP; 2008 (in Russian).
5. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 2. Moscow; 2015. Available from: <http://193.232.7.107/feml>.
6. The State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus. Minsk: Tsentr ekspertiz i ispytaniy v zdorovoohranenii; 2009 (in Russian).
7. The State Pharmacopoeia of Ukraine. 1st ed. Suppl. 1–4. Kharkov: Nauchno-ekspertnyy farmakopeyny tseentr; 2012 (in Russian).
8. The State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. V. I. Almaty: Zhibek Zholy; 2008 (in Russian).
9. British Pharmacopoeia, 2009. V. 1–4.
10. European Pharmacopoeia. 8th ed. Available from: <http://online.edqm.eu/entry.htm>.
11. The International Pharmacopoeia (First and Second Supplements). 4th ed. 2011. Available from: <http://apps.who.int/phint/en/p/about/>.
12. United States Pharmacopeia. 35th ed. Available from: <http://www.uspnf.com/uspnf/login>.
13. State Standard 8.315–97 GSI. Standard samples of structure and properties of substances and materials. The main provisions. Moscow: Izdatelstvo standartov; 2004 (in Russian).
14. State Standard P 8.753–2011 GSI. Standard samples of materials (substances). Fundamentals. Moscow: Standartinform; 2013 (in Russian).
15. State Standard 8.532–2002 GSI. Standard samples of structure and properties of substances and materials. Interlaboratory metrological certification. Content and procedure of works. Moscow: Izdatelstvo standartov; 2003 (in Russian).
16. State Standard P 8.563–2009 GSI. Techniques (methods) of measurements. Moscow: Standartinform; 2010 (in Russian).
17. State Standard P 8.694–2010 (ISO Guide 35:2006, MOD) GSI. Standard samples of materials (substances). General and statistical principles for determining the metrological characteristics of reference materials. Moscow: Standartinform; 2012 (in Russian).
18. Bondarev VP, Borisevich IV, Volkova RA, Fadeikina OV. Industry reference standards certification for the control of medical immunobiological preparations. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* 2013; (2): 28–32 (in Russian).
19. Volkova RA. Methods of control or testing procedures — the issue of metrological support of analytical methods. *Spravochnik zaveduyuschego KDL* 2013; (4): 4–9 (in Russian).
20. Merkulov VA, Sakanyan EI, Volkova RA, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkir VA. Modern approaches to the development of standard

- models for assessing the quality of pharmaceutical substances. *Himiko-farmatsevticheskiy zhurnal* 2015; 49(11): 54–6 (in Russian).
21. WHO Expert Committee on biological standardization. Recommendations for the preparation and establishment of international and other biological reference standards. Technical Reports Series № 932. Annex 2. Geneva: WHO; 2004. P. 73–131, 137.
 22. ISO Guide 30:1992. Terms and definitions used in connection with reference material [cited 2016 Mar 14]. Available from: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=21638.
 23. ISO Guide 31:2001 (Released: 31:2015) Reference material — Content of certificates and labels [cited 2016 Mar 14]. Available from: <http://www.en-standard.eu/iso-guide-31-reference-materials-contents-of-certificates-and-labels/>.
 24. ISO Guide 33:2002. Uses of certified reference materials [cited 2016 Mar 14]. Available from: <http://www.en-standard.eu/iso-guide-33-uses-of-certified-reference-materials/>.
 25. ISO Guide 34:2009. General requirements for the competence of reference material producers [cited 2016 Oct 31]. Available from: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=50174.
 26. ISO Guide 35:2006 Reference Material — General and statistical principles for certification [cited 2015 Mar 14]. Available from: <http://www.en-standard.eu/iso-guide-35-reference-materials-general-and-statistical-principles-for-certification/>.
 27. State Standard P 8.691–2010 (ISO Guide 31:2000, MOD) GSI. Standard samples of materials (substances). General requirements for passports and labels. Moscow: Standartinform; 2012 (in Russian).
 28. State Standard P 8.824–2013 (ISO Guide 34:2009, IDT). General requirements for the competence of reference materials producers. Moscow: Standartinform; 2014 (in Russian).
 29. WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines. WHO/IVB/11/03. June 2011.
 30. Federal Law of the Russian Federation, June 26, 2008, № 102-FZ «On ensuring the uniformity of measurements» (in Russian).
 31. Resolution of the Government of the Russian Federation, November 2, 2009, № 884. The position of the State service of reference materials of composition and properties of substances and materials (in Russian).
 32. State Standard RMG 93–2009 GSI. Estimation of metrological characteristics of reference materials. Moscow: Standartinform; 2009 (in Russian).
 33. State Standard P 50.2.058–2007 GSI. Evaluation of uncertainty of certified values of standard samples. Moscow: Standartinform; 2008 (in Russian).
 34. Guideline of Eurachem/CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. St. Petersburg: D. I. Mendeleev VNIIM; 2002 (in Russian).
 35. International Dictionary of Metrology: Basic and general concepts and associated terms. St. Petersburg: Professional; 2010 (in Russian).
 36. International Vocabulary of Metrology — Basic and general concept and associated terms (VIM). Guide JCGM 200:2008 [cited 2016 Mar 14]. Available from: https://iupac.org/publications/ci/2008/3006/bw2_vim.html.
 37. Volkova RA. Quality control of medical immunobiological preparations of chemical and immunochemical methods. *Dr. Biol. Sci [thesis]*. Moscow; 2009 (in Russian).
 38. Volkova RA. Problems of metrological support of quality assessment methods of immunobiological drugs. In: I International Conference «Reference materials and measurement technology». Proceedings. Part 1. Ekaterinburg; 2013. P. 88–90 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Volkova RA. Head of the laboratory of molecular biology and genetic testing methods of Testing Centre for quality expertise of medical immunobiological preparations. Doctor of Biological Sciences.

Fadeikina OV. Chief technologist of Testing Centre for quality expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Klimov VI. Deputy director of Centre for the planning and coordination of scientific research. Candidate of Medical Sciences.

Sakanyan EI. Director of Centre for pharmacopoeia and international cooperation. Doctor of Pharmaceutical Sciences, professor.

Movsesyants AA. Head of Testing Centre for quality expertise of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Olefir YuV. Director-General. Doctor of Medical Sciences.

Merkulov VA. Deputy Director-General for Evaluation of Medicinal Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Bondarev VP. Director of Centre for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Borisevich IV. Director of Centre for the planning and coordination of scientific research. Doctor of Medical Sciences, professor.

Shvedov DV. Deputy head of Testing Centre for quality expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Medical Sciences.

Исследование кросс-реактивности терапевтических препаратов на основе моноклональных антител на тканях человека: основные подходы и методические приемы

Т. Ю. Остроухова, В. А. Иванов, Е. Л. Морозова, Р. А. Иванов

ЗАО «БИОКАД», п. Любучаны, Чеховский район, Московская область

Поступила 30.09.2016 г. Принята к публикации 17.11.2016 г.

Исследование тканевой перекрестной реактивности (кросс-реактивности, TCR, Tissue cross-reactivity) представляет собой скрининговое иммуногистохимическое исследование, которое обычно проводят на замороженных тканях человека и животных. Данное исследование обязательно для получения разрешения на клинические исследования в Российской Федерации любого инновационного терапевтического препарата на основе моноклональных антител или антителоподобных молекул, содержащих участок, определяющий комплементарность (complementarity-determining region, CDR). В данной статье представлены подходы для изучения и методические приемы для успешного проведения исследования тканевой перекрестной реактивности с примерами из собственного опыта авторов.

Ключевые слова: исследование тканевой перекрестной реактивности (кросс-реактивности) препарата (TCR); моноклональное антитело; иммуногистохимический (ИГХ) анализ.

Библиографическое описание: Остроухова ТЮ, Иванов ВА, Морозова ЕЛ, Иванов РА. Исследование кросс-реактивности терапевтических препаратов на основе моноклональных антител на тканях человека: основные подходы и методические приемы. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (4): 237–244.

Исследование тканевой перекрестной реактивности (кросс-реактивности, TCR) терапевтических препаратов на основе моноклональных антител или антителоподобных молекул обычно представляет собой скрининговое иммуногистохимическое исследование. Исследования данного типа необходимы для идентификации как ожидаемого, таргетного связывания в тканях человека, так и непредусмотренного, нетаргетного и нежелательного связывания биопрепаратов в тканях, но при этом специфического, т.е. опосредованного CDR-участком антитела, так называемой перекрестной реактивности, или кросс-реактивности. Таким образом, в ходе такого исследования могут быть выявлены новые мишени и сайты связывания в тканях, ранее неизвестные как содержащие искомый антиген. Кроме того, исследование кросс-реактивности может быть использовано для подтверждения и (или) подбора релевантного вида для проведения доклинических исследований, при использовании тканей животных соответственно. В связи с этим целью настоящей статьи было раскрыть основные подходы и методические приемы для успешного проведения данного типа исследований.

Данный тип исследования является обязательным для получения разрешения на клинические исследования I фазы для оригинальных препаратов в Российской Федерации (РФ) и за рубежом (в Европе, США и Японии). Ключевыми параметрами, необходимыми для успешного проведения TCR-исследования, являются следующие: материал — замороженные ткани человека и животных (например, нечеловекообразных обезьян), собранные и хранящиеся соответствующим образом; наличие правильно подобранных контролей: положительного контроля — клеток или тканей, экспрессирующих мишень (антиген), отрицательного контроля, и соответственно подобранный метод окрашивания. Далее мы остановимся на каждом из них.

Сбор, подготовка и фиксация тканей для исследования. В соответствии с требованиями РФ исследова-

ние перекрестной реактивности должно быть проведено на 26 типах нормальных тканей одного донора: миндалины, тимус, лимфатические узлы, костный мозг, клетки крови, легкие, печень, почки, желчный пузырь, селезенка, желудок, кишечник, поджелудочная железа, околоушная железа, щитовидная железа, паращитовидная железа, надпочечник, гипофиз, головной мозг, периферические нервы, сердце, поперечно-полосатые мышцы, яичник, яичко, кожа, кровеносные сосуды [1, 2]. Требования американского Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (U. S. Food and Drug Administration, FDA) и Европейского медицинского агентства (European Medicines Agency, EMA) несколько иные: исследование должно быть проведено на 26 (EMA) или 32 (FDA) типах нормальных тканей от трех разных доноров, с использованием не менее двух концентраций биопрепарата и, обычно, в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики GLP [3, 4]. Причем хирургический материал, при условии, что ткань нормальная, является более предпочтительным (но обычно недоступным в реальных условиях), чем аутопсийный. Последний может быть использован в течение не более 24 ч с момента смерти, поскольку большинство эпителиев¹ не подвергаются аутолизу² в течение данного периода. В случае использования тканей животных, по требованиям FDA и EMA, но не РФ, рекомендуется использование не менее двух доноров для каждого типа ткани [6].

Для TCR-исследования чаще всего используют замороженные ткани. С точки зрения морфологии, качество срезов замороженных тканей часто хуже по сравнению с

¹ Эпитоп — часть молекулы антигена, взаимодействующая с антигенсвязывающим центром антител или Т-клеточного рецептора [5].

² Аутолиз — распад белков тканей организма, происходящий под влиянием специфических клеточных ферментов этих тканей (капсинасов и др.) [7].

заклученными в парафин, поэтому процесс замораживания тканей является критическим моментом в подготовке к исследованию. Сразу после извлечения кусочка ткани от донора необходимо погрузить его в специальную смесь «ОСТ» (смесь для оптимальной вырезки, optimal cutting temperature compound) и максимально быстро заморозить кусочек ткани в этой смеси в азоте. После такой шоковой заморозки кусочек ткани может быть помещен в сухой лед для последующей транспортировки к месту хранения.

Замораживание в сухом льду или морозильной камере от минус 80 °С до минус 20 °С может повлечь за собой образование больших кристаллов льда, которые ухудшают морфологию ткани и усложняют дельнейшую интерпретацию результатов. Замороженные ткани необходимо хранить при минус 80 °С в герметичных контейнерах в защищенном от света месте.

Толщина срезов, изготавливаемых на криостате, обычно составляет от 4 до 6 мкм, в нашей лаборатории традиционно — 5 мкм. Далее срезы, монтированные на стекле, помещают или в изотонический буфер или сразу подвергают фиксации. Поскольку последнее может повлечь за собой значительное изменение сохранности эпителиев и изменить характер иммуноокрашивания в ткани, то подбор правильного фиксатора очень важен. Хотя не существует единого фиксирующего агента, идеально подходящего для всех вариантов антигенов и одновременно позволяющего сохранить морфологию ткани, или, например, иммобилизовать растворимые антигены, короткий период фиксации обычно все же используется для замороженных срезов сразу после их получения. Таким образом, подбор фиксатора может быть проведен «индивидуально» в качестве этапа отработки метода, так как разные фиксаторы имеют различный механизм действия. В некоторых случаях в исследовании могут быть использованы нефиксированные ткани или фиксированные в формалине/параформальдегиде, заключенные в парафин, но такие случаи исключения из общего правила [6]. В нашей лаборатории традиционно используется ацетон: фиксация холодным ацетоном (минус 20 °С) в течение 10 мин, сушка на воздухе при комнатной температуре в течение 2–24 ч. Фиксированные срезы хранятся в защищенном от света месте от минус 70 °С до минус 80 °С.

Контроль сохранности морфологии и антигенов ткани. Нами принято проверять сохранность ткани и ее антигенов после получения, хранения и фиксации. Для этого можно использовать антиген повсеместно присутствующий во всех тканях в высокой концентрации, например, бета-2-микроглобулин, молекулу адгезии эндотелия и тромбоцитов 1 (или CD31, PECAM-1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1), рецептор трансферрина (CD71). Отсутствие окрашивания ткани на один из таких антигенов является поводом выбраковки данной ткани (среза, кусочка) из исследования [6]. Нами традиционно используются антитела против бета-2-микроглобулина — низкомолекулярного белка, представляющего собой легкую бета-цепь антигенов HLA класса I, которые имеются на поверхности практически всех клеток тканей. Наличие специфического окрашивания на бета-2-микроглобулин позволяет предполагать (но не гарантировать) сохранность и других антигенов, в том числе искомого, в изучаемых в эксперименте тканях. Обычно специфическое окрашивание на бета-2-микроглобулин очень яркое (рис. 1).

Блокировка неспецифического связывания. Для снижения уровня фона используют различные белки (сыворотка крови, альбумин, казеин, иммуноглобулины) или

их смеси. Их наносят на срезы и инкубируют до нанесения первичных антител. Они могут связываться с Fc-рецепторами³ в тканях (если содержат иммуноглобулины), блокируя, таким образом, неспецифические (не CDR-опосредованные) взаимодействия терапевтического антитела, или могут насыщать сайты связывания белков в тканях, снижая вероятность адгезии различных реагентов тест-системы в тканях. Нами обычно используется готовая смесь — так называемый протеиновый блок, содержащий казеин.

Кроме того, важным пунктом блокировки неспецифического связывания является блокировка эндогенных ферментов (миелопероксидазы и тиропероксидазы, например), а в некоторых случаях и эндогенного биотина. Эндогенные ферменты реагируют с хромогеном и аналогичны пероксидазе хрена или щелочной фосфатазе. Последние используются в тест-системе в качестве детектирующих ферментов [6].

Положительный и отрицательный контроли исследования. Минимальным критерием приемлемости ИГХ-анализа и возможности его интерпретации является, во-первых, наличие окрашивания положительного контрольного материала (ткани, клеток) искомыми терапевтическими антителами. Во-вторых, отсутствие окрашивания отрицательного контрольного материала. В-третьих, отсутствие окрашивания как положительного, так и отрицательного контролей антителами отрицательного контроля (изотипическими, например), в той же концентрации и тем же выбранным методом. Таким образом, выбор соответствующей контрольной ткани, клеток или очищенного белка — это критический параметр успешного проведения исследования. Теоретически, идеальным положительным контролем исследования является нормальная ткань с высокой экспрессией искомого антигена. Но такая ситуация практически не встречается в условиях исследования. Например, экспрессия антигена в нормальной здоровой ткани может быть невелика, а возрастает только в патологических условиях, и чувствительность метода не позволяет выявить антиген. В этом случае можно использовать варианты тканей при этих заболеваниях [6].

Другие варианты положительного контрольного материала — это использование клеточных линий, экспрессирующих искомый антиген, или очищенного антигена. Здесь нужно помнить о некоторых ограничениях: экспрессия антигена в клеточной линии может быть выше, или ниже его экспрессии в нормальных тканях, или фон и (или) неспецифическое окрашивание может быть иным, чем в нормальных тканях. Все это может привести к тому, что рабочая концентрация антител в разработанном методе будет не оптимизирована для окрашивания нормальных тканей, и, в конечном итоге, повлиять на интерпретацию результатов анализа [6].

В последнее время в нашей лаборатории используют клетки, экспрессирующие заданный антиген. Это могут быть клетки как нативно экспрессирующие антиген, так и трансфицированные им. Особенно это удобно в случае растворимых антигенов, которые после трансфекции локализованы в гранулах цитоплазмы, а также содержатся в более высокой концентрации, чем в нормальных тканях, что позволяет разработать пусть не идеальный, но соот-

³ Fc-рецепторы — поверхностные молекулы на разных типах клеток, которые связываются с Fc-фрагментом иммуноглобулинов [5].

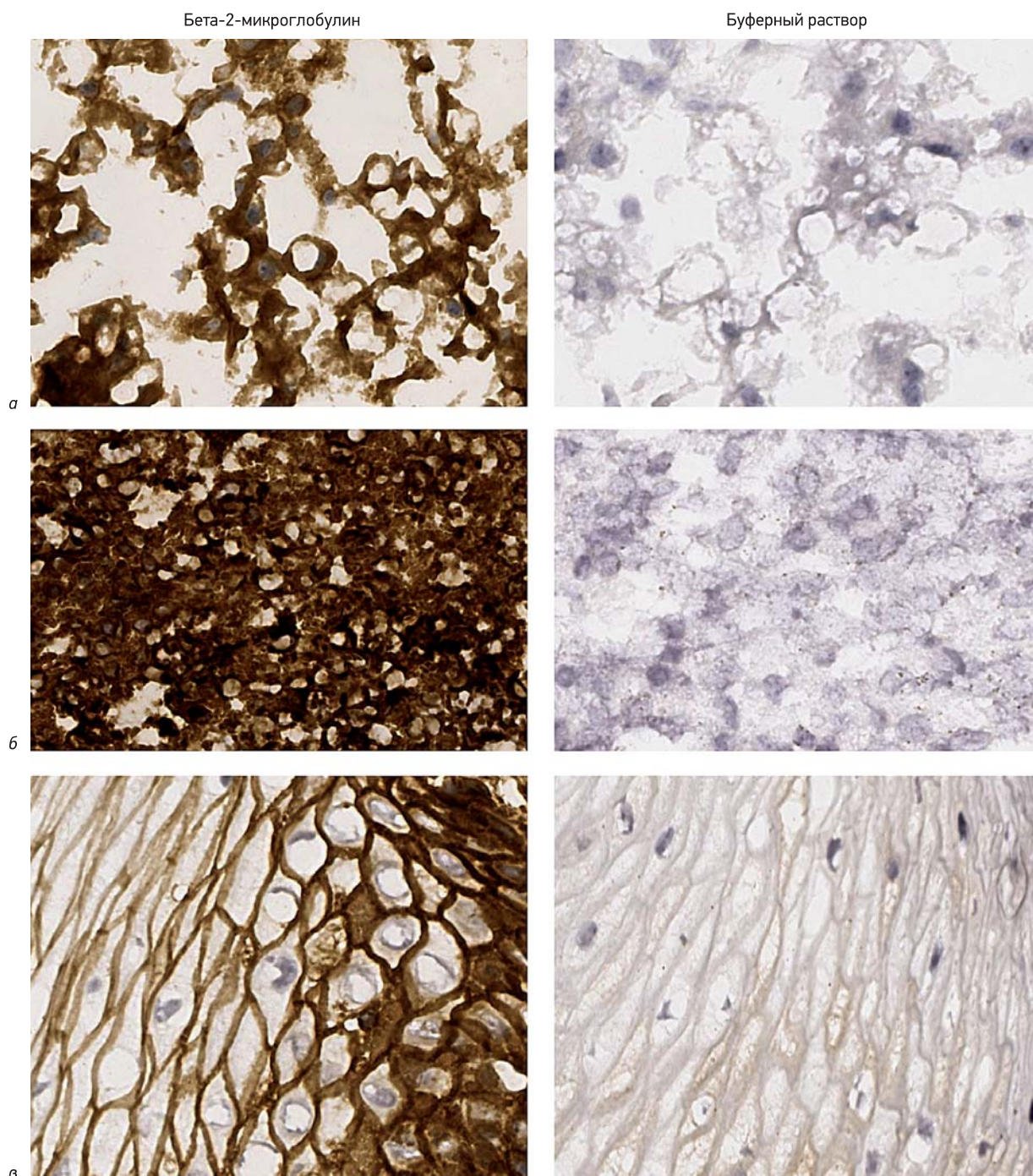


Рис. 1. Иммунопероксидазная идентификация бета-2-микроглобулина в нормальной ткани лимфоузла (а), селезенки (б) и мочевого пузыря (в) человека. Слева — использовали антитела к бета-2-микроглобулину в качестве первичных антител (опытный срез), справа — использовали буфер для разведения первичных антител (контрольный срез).

ветствующий критериям приемлемости вариант метода для проведения TCR-исследования.

Использование очищенного антигена, ковалентно связанного с матриксом, например, с агарозой или полистиреновыми шариками, также может служить хорошей альтернативой, если терапевтическое антитело направлено против антигена, не присутствующего в тканях в нормальных условиях, например, инфекционного или токсического агента.

Отрицательный контрольный материал не менее важен в исследовании, чем положительный, и, в идеале,

должен быть аналогичен по формату, что и положительный контрольный материал, но при этом не должен содержать искомый антиген, или антигены, сходные и (или) кросс-реактивные с искомым. Таким образом, отрицательный контрольный материал не должен окрашиваться исследуемыми терапевтическими антителами [6].

В TCR-исследовании необходимо различить (насколько возможно точно) специфическое связывание, опосредованное взаимодействием с CDR-участком терапевтического антитела, и неспецифическое связывание, опосредованное взаимодействием, например, с Fc-рецеп-

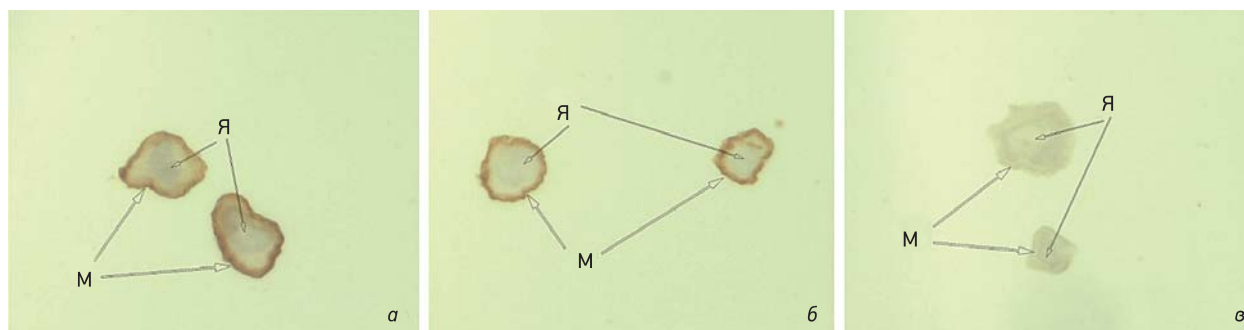


Рис. 2. Иммунопероксидазная идентификация антигена HER2 в клетках рака молочной железы BT-474 (положительные контрольные клетки в исследовании). В качестве первичных антител использовали: а — трастузумаб (производства ЗАО «Биокад»), меченный ФИТЦ; б — Герцептин®, меченный ФИТЦ, в — контрольные антитела — IgG человека, меченные ФИТЦ. Я — ядро клетки, М — мембрана клетки.

торами в тканях. Поскольку терапевтические антитела, используемые в TCR-исследованиях в качестве первичных антител, обычно являются гуманизированными или полностью человеческими, то неправильно ориентироваться на разницу между окрашиванием терапевтическими антителами и фоном, получаемым при окрашивании с заменой первичных антител на буферный раствор, как это принято при использовании нечеловеческих антител. Поэтому для того, чтобы интерпретации результатов и характера связывания была возможной, следует использовать соответствующие отрицательные контрольные антитела, обычно такого же изотипа, что и терапевтические антитела — изотипический контроль исследования [6]. В нашей лаборатории используются коммерческие изотипические контрольные антитела, которые представляют собой рекомбинантные человеческие антитела, выработанные к белку, не присутствующему в организме человека. Данные изотипические антитела имеют тот же изотип и конъюгированы с той же меткой, что и терапевтические. И при разработке типа метода, и подборе рабочей концентрации антител нами принято ориентироваться на разницу окрашивания положительного контрольного материала терапевтическими антителами и изотипическими контрольными антителами (фон). Фон должен быть ниже, чем специфическое окрашивание на ткани (клетках) положительного контроля (рис. 2, 3). В случае если терапевтическое антитело представляет собой мутантное антитело, или антителоподобную молекулу, то оптимальным отрицательным контролем является антитело или молекула, аналогичная по структуре, но не связывающаяся с человеческими эпитопами. Если в исследовании используется меченное терапевтическое антитело, то аналогичная метка должна быть и у антител отрицательного контроля.

Еще один вариант отрицательного контроля, который часто включается в TCR-исследование, это срезы тканей, на которые вместо первичных антител («опытных» или изотипических) нанесен буфер. Такой тип контроля дает информацию о фоновом окрашивании при нанесении всех остальных реактивов методики, кроме первичных антител (например, остаточной эндогенной пероксидазой) или характерном для самой ткани (например, при наличии пигментов) [6].

Выбор метода окрашивания и подбор концентрации антител. Не существует единого оптимального метода для всех типов исследуемых антител. Концентрации исследуемых терапевтических антител (обычно гуманизированных или полностью человеческих), используемые в TCR-исследовании, обычно имеют диапазон 0,5–50 мкг/мл. В то же время, концентрации эндогенных иммуноглобули-

нов IgG, присутствующих в организме и тканях человека, превышают эти концентрации во много раз. Таким образом, выявление специфического связывания исследуемого антитела с тканями человека в присутствии высоких концентраций эндогенных человеческих антител является очень непростой задачей. Именно поэтому метод окрашивания с использованием такого рутинного реактива, как меченных антител против человеческих иммуноглобулинов типа G (IgG), в данном случае не подходит из-за появления высокого фона окрашивания и, соответственно, невозможности правильно интерпретировать результаты исследования. В TCR-исследовании могут быть использованы как прямой, так и непрямой методы окрашивания. Прямой метод окрашивания характеризуется использованием терапевтического антитела, ковалентно связанного с меткой (пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, биотин), без использования каких-либо вторичных антител. В этом случае, для выявления антител может быть использован соответствующий субстрат хромогена (диаминобензидин (ДАБ) для пероксидазы хрена, тетразолий нитросиний хлористый для щелочной фосфатазы) или авидин/стрептавидин, меченный ферментом (обычно пероксидазой хрена), если метка биотиновая. Последний вариант характеризуется более высокой чувствительностью метода по сравнению с первым. В случае непрямого метода окрашивания используются вторичные и даже третичные антитела для выявления искомым терапевтических антител. Например, когда терапевтическое антитело предварительно конъюгирует с флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ) и выявляют с помощью антител против ФИТЦ. В некоторых редких случаях, могут быть использованы вторичные меченные антитела против человеческих иммуноглобулинов типа G4 (IgG4), если первичное терапевтическое антитело представляет собой IgG4, так как концентрация иммуноглобулинов этого типа по сравнению с остальными типами в организме человека невысока, и фон неспецифического окрашивания получается довольно низкий. Иногда для исследователей доступны анти-идиотипические антитела, т.е. связывающиеся с гипервариабельным участком⁴ терапевтического антитела. В таком случае, если сайт их связывания в гипервариабельном регионе не перекрывается с сайтом, связывающим антиген, то они могут быть использованы как вторичные антитела в ИГХ-исследовании. Третичные антитела, меченные фер-

⁴ Гипервариабельная область (участок) — наиболее вариабельные области V-доменов иммуноглобулинов и цепей T-клеточного рецептора. Вариабельные области расположены в дистальной части V-домена и формируют антигенсвязывающий центр [5].

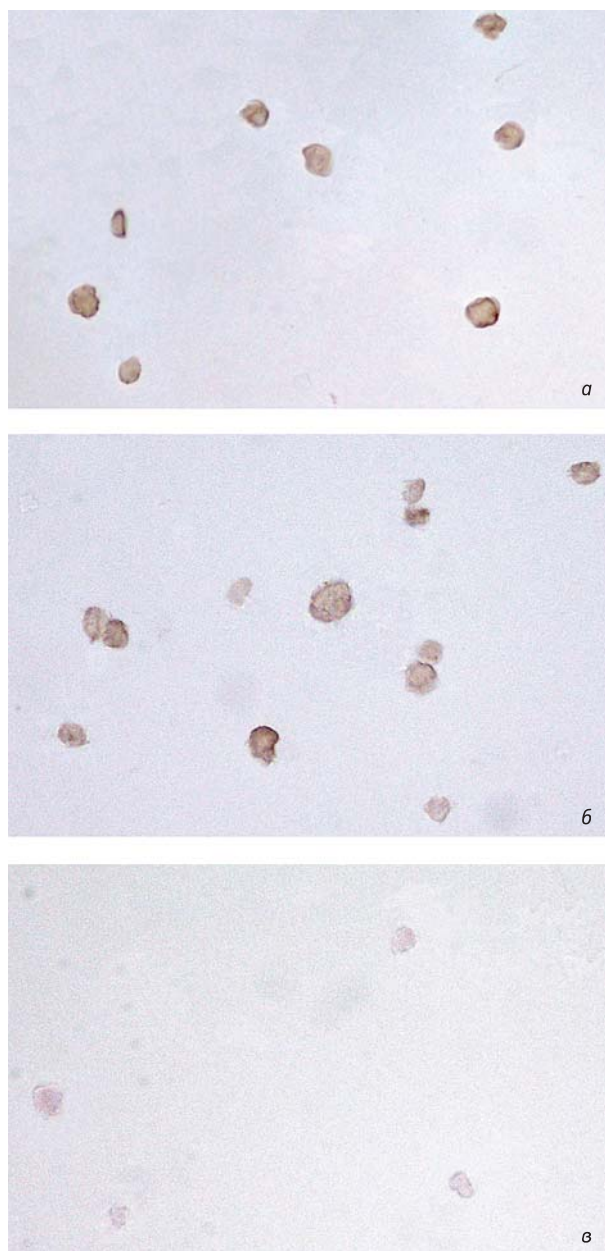


Рис. 3. Иммунопероксидазная идентификация антигена ФНО α в клетках CHO-FlpIn cl.41, экспрессирующих ФНО α . В качестве первичных антител использовали: а — препарат Адалимумаб, меченный биотином (ЗАО «Биокад»), б — препарат Хумира® (производства «Эбботт Лэбораториз Лтд», Великобритания), меченный биотином, в — контрольные изотипические антитела, меченные биотином.

ментной меткой или биотином, используются для выявления антиидиотипических антител (обычно мышиных или кроличьих) [6].

Решение по выбору оптимального метода обычно основывается на опыте лаборатории и нацелено, с одной стороны, на сохранении высокого специфического сигнала, при одновременном наличии наименьшего фона и неспецифического окрашивания, с другой. В наших условиях чаще всего используется прямой метод иммуногистохимического окрашивания препаратом терапевтического антитела, предварительно меченного биотином, или не-прямой метод с использованием ФИТЦ-метки, и, гораздо

реже, вариант с формированием предкомплексов. В случае метода предкомплексов, до нанесения антител на срезы в пробирке формируются комплексы из искомого терапевтического антитела, и меченных антител против человеческих IgG. В наших условиях обычно формируются такие комплексы при комнатной температуре в течение 30 мин и далее немедленно перемещаются на лед и хранятся при температуре 4 °C. Для блокирования неспецифического связывания на срезах анти-IgG антител, непосредственно перед нанесением данной смеси предкомплексов на срезы, в нее добавляют избыток человеческого иммуноглобулинов IgG. Нами обычно используется избыток в 300 раз человеческого гаммаглобулина. Эту смесь наносят на срезы и инкубируют как обычные первичные антитела. Вторичные антитела используют в зависимости от метки анти-IgG антител. Успех применения данного метода зависит от правильно подобранного соотношения всех трех компонентов смеси предкомплексов. Технически, это более сложный и неудобный метод, поэтому в нашей лаборатории используется крайне редко, лишь в случае, если другие варианты методов окрашивания показали неудовлетворительные результаты. С другой стороны, преимущество этого метода состоит в том, что в исследовании используется терапевтическое антитело, ни с чем не конъюгированное. Очень важно помнить о том, что конъюгируемое с меткой терапевтическое антитело по связывающим характеристикам может значительно отличаться от исходного. Поэтому рекомендуется предварительно проверять наличие и значимость изменений его антиген-связывающих характеристик с помощью другого доступного метода (поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитофлуометрии, ИФА и т.п.).

Как уже было сказано выше, подбор концентрации терапевтических антител для окрашивания происходит опытным путем. В Европе и США требуется окрашивание тканей с использованием, как минимум, двух концентраций, одна из которых может быть названа «идеальной» — это наиболее низкая концентрация, при которой связывание максимально, т.е. соотношение положительного и отрицательного окрашивания максимально. Обычно это концентрация варьирует от 2 до 10 мкг/мл. По требованиям РФ достаточно использовать одну концентрацию, но принцип ее подбора точно такой же [6].

Оценка окрашивания исследуемым терапевтическим антителом и интерпретация результатов исследования. Для оценки результатов окрашивания и их представления в отчете учитываются такие параметры как: гистологическая характеристика клеточных элементов/типов окрашенных клеток, характер окрашивания (специфическое/неспецифическое окрашивание), субклеточная локализация (мембранная и (или) цитоплазматическая), а также степень (яркость) окрашивания.

Во время оценки результатов исследования и оценки окрашивания клеточных элементов (тканей) одним из самых важных пунктов является дифференцировка специфического, неспецифического или фонового связывания. Фоновое окрашивание характерно для данной конкретной ткани или используемого ИГХ-метода. Например, некоторым тканям (клеткам) свойственно иметь высокий фон, вследствие наличия эндогенных пигментов (гепатоциты и т.п.) или эндогенной пероксидазы (эозинофилы, тучные клетки и т.п.). Неспецифическое окрашивание, напротив, относится к избыточному окрашиванию первичными антителами (исследуемыми или отрицательными контрольными антителами), опосредованному неспеци-

фическими (не зависящими от CDR-участков) взаимодействиями антител с различными клеточными или внеклеточными элементами. Как уже отмечалось выше, это может происходить вследствие связывания с Fc-рецепторами тканей, или неспецифических гидрофобных или электростатических взаимодействий с тканями. Избыток первичных или вторичных антител обычно увеличивает неспецифическое связывание. В некоторых случаях требуется дополнительное подтверждение специфичности связывания. Для этого могут быть проведены отдельные так называемые «блокирующие TCR-исследования», суть которых заключается в добавлении или растворимого антигена в первичные антитела, или немеченого антитела, для снижения сигнала (окрашивания), если сигнал специфичен. Отсутствие снижения связывания говорит о неспецифичности сигнала (окрашивания) [6].

Для конечной интерпретации и оценки результатов исследования важно учитывать и пространственную локализацию антигена в клетке. Если это мембранный антиген, против которого направлено терапевтическое антитело, то специфическое окрашивание цитоплазмы клеток не должно вызывать больших опасений со стороны исследователей, так как «доступ» препарата при данной субклеточной локализации, скорее всего, будет очень низок или невозможен. Кроме того, существуют такие естественные барьеры, как, например, гематоэнцефалический, гематотестикулярный барьер и другие, которые характеризуются наличием специализированного эндотелия, снижающего переход антител и других крупных молекул сквозь него в орган [6].

Степень окрашивания характеризуется не только яркостью окрашивания, но и количеством окрашенных клеточных элементов (плотностью). В нашей лаборатории чаще всего используется 5-балльная шкала интенсивности: 0 (негативное) — нет окрашенных клеток; 1 — минимальное (слабое) окрашивание или <25 % окрашенных клеток; 2 — слабое (легкое) окрашивание или 25–50 % окрашенных клеток; 3 — среднее окрашивание или 50–75 % окрашенных клеток; 4 — интенсивное (яркое) окрашивание или 75–100 % окрашенных клеток. Кроме того, может быть использована бесплатная программа ImageJ⁵ для более объективной оценки, в случае, если гистолог или патолог, оценивающий окрашивание, пока не слишком опытный. Оценка может быть проведена также в программном обеспечении на таких типах специализированных приборов, как сканирующий микроскоп Aperio⁶ («Leica Biosystems», Германия). Но в этом случае необходимы довольно сложные предварительные настройки, чтобы оценка была проведена действительно объективно.

Алгоритм проведения исследования тканевой перекрестной реактивности. В нашей лаборатории разработан следующий план, по которому проводится данный тип исследования:

1. На доступном материале положительного и отрицательного контролей в качестве самопроверки отработывается окрашивание на искомый антиген коммерческими

антителами, для выявления характера окрашивания (мембранного и (или) цитоплазматического).

2. Изучаемый препарат терапевтических антител конъюгируется с ФИТЦ или биотином.

3. Обработка окрашивания изучаемым препаратом терапевтических антител (подбор условий, метода и концентрации антител) образцов положительных и отрицательных контрольных тканей (клеток). Общий характер окрашивания должен соответствовать получаемому с помощью коммерческих антител. В случае если метод с использованием меченных ФИТЦ или биотином терапевтических антител не дает удовлетворительных результатов, испытывается метод предкомплексов.

4. Сначала пробное (несколько тканей, например), затем полное (всех тканей, которые должны быть задействованы в эксперименте) окрашивание тканей антителами против бета-2-микроглобулина (анализ антигенной сохранности ткани).

5. Окрашивание интересующих тканей человека и приматов выбранным методом (собственно TCR-исследование).

6. Анализ окрашивания и представление результатов в балльной шкале.

Особенности использования результатов исследования. Заключение. Изначально TCR-исследование, имеющее цель изучить непредусмотренное связывание в тканях, было призвано предупредить исследователей в отношении потенциальных органов-мишеней для токсичности в доклинических и клинических исследованиях, на основе сравнения характера окрашивания тканей у животных и человека. Предполагалось, что интенсивность, распределение в тканях и частота окрашивания увеличивают вероятность токсичности в них *in vivo*. Но, по мере накопления данных и сопоставления результатов TCR-исследований и токсичности обнаружилось, что корреляция не всегда существует и не столь однозначна. Как оказалось, присутствие яркого окрашивания не всегда связано с какими-либо эффектами *in vivo* в этом органе или ткани. Причин для этого может быть несколько. Во-первых, не всегда вообще можно добиться окрашивания исследуемыми терапевтическими антителами даже тех тканей, в которых доказано (другими методами) наличие искомого антигена, так как терапевтические антитела не предназначены для ИГХ-анализа. Во-вторых, несмотря на наличие множества контролей в анализе, исключительно из результатов данного исследования не всегда очевидно, относится ли связывание к непредусмотренной, но специфической реактивности, неспецифическому связыванию, или является даже артефактом методики. В-третьих, такие процессы подготовки ткани к окрашиванию, как подсушивание и фиксация, а также блокировка эндогенной пероксидазы, могут изменить тканевые эпитопы или даже образовать новые химические структуры (эпитопы), не существующие *in vivo*. Одновременно, детектирование существующих *in vivo* эпитопов может быть затруднено по причине не очень высокой чувствительности метода или вследствие снижения доступа к ним или нарушения их пространственной структуры, например, из-за фиксации ткани. Поэтому связывание антител с антигенами в тканях *ex vivo* может отличаться от истинного, существующего *in vivo*, что и приводит к различиям в результатах исследований. В-четвертых, некоторые эффекты препарата *in vivo* могут напрямую не относиться к связыванию препарата в тканях.

Таким образом, поскольку окрашивание тканей *ex vivo* необязательно коррелирует с токсичностью в этих

⁵ ImageJ — свободно распространяемая программа, предназначенная для анализа и обработки изображений. Она написана на языке Java и создана командой разработчиков из National Institutes of Health. <https://imagej.nih.gov/ij/>.

⁶ Aperio — <http://www.leicabiosystems.com/digital-pathology/aperio-digital-pathology-slide-scanners/>.

тканях *in vivo*, TCR-исследование называется скрининговым и требует, порой, дополнительных анализов и исследований для выявления природы связывания (окрашивания). В некоторых случаях, когда TCR-исследование не может быть проведено по причинам невозможности разработать адекватный метод окрашивания, удовлетворяющий всем критериям приемлемости, и при наличии обоснования, то отсутствие результатов этого исследования в досье не должно препятствовать продвижению препарата далее, т.е. проведению клинических исследований [6].

Несмотря на все вышеперечисленные ограничения, сравнительное исследование перекрестной реактивности в тканях человека и животных все же может быть использовано для выбора релевантного вида животных для доклинических исследований. В этом случае исследование проводится сначала на тканях человека, и те же ткани, которые продемонстрировали связывание, могут быть взяты у животных для оценки характера связывания, и ими можно ограничиться. В случае если общий характер окрашивания тканей, типов клеток и субклеточной локализации антигена сопоставим или близок у изучаемого вида животных к человеческому, то именно он может быть предпочтителен для выбора как релевантного в доклинических исследованиях.

Поскольку результаты тканевой перекрестной реактивности по-разному коррелируют с результатами токсичности или эффективности препарата, то данный тип исследования необходимо рассматривать как скрининговый и вспомогательный, и результаты его должны быть оценены

и интерпретированы в дальнейшем только в общем контексте всех результатов о безопасности и фармакологической оценке препарата. Кроме того, данный тип исследования не проводится при необходимости сравнения изменений в производственном процессе препарата или смены клеточных линий-продуцентов, а также для биологических препаратов, не содержащих CDR-участок.

Литература

1. Медицинские иммунобиологические препараты. Организация производства и контроль качества моноклональных антител. Методические рекомендации. Приложение № 2; МР 3.3.2.2359–08.
2. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2015.
3. Guideline on Development, Production, Characterization and Specifications for Monoclonal Antibodies and Related Products. Annex I. EMEA; 2009.
4. Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use. Appendix I. FDA; 1997.
5. Мейл Д, Бростофф Дж, Пот ДБ, Роузм А. Иммунология. М.: Логосфера; 2007.
6. Leach MW, Halpern WG, Johnson CW, Rojko JL, MacLachlan TK, Chan CM, Galbreath EJ, Ndifor AM, Blanset DL, Polack E, Cavagnaro JA. Use of Tissue Cross-reactivity Studies in the Development of Antibody-based Biopharmaceuticals: History, Experience, Methodology, and Future Directions. *Journal of Toxicologic Pathology* 2010; 38: 1138–66.
7. Петровский БВ, ред. Большая Медицинская Энциклопедия. 3-е изд. Т. 2. М.: Советская энциклопедия; 1975.

Об авторах

Закрытое акционерное общество «БИОКАД» (ЗАО «БИОКАД»). Российская Федерация, 142380, Московская обл., Чеховский район, п. Любучаны, ул. Научная, 1.

Остроухова Татьяна Юрьевна. Заведующая лабораторией иммунологических методов отдела доклинических испытаний лекарственных средств, канд. биол. наук.

Иванов В. А. Научный сотрудник отдела доклинических испытаний лекарственных средств.

Морозова Елена Леонидовна. Руководитель отдела доклинических испытаний лекарственных средств.

Иванов Роман Алексеевич. Вице-президент по разработкам и исследованиям, канд. мед. наук.

Адрес для переписки: Остроухова Татьяна Юрьевна; ostroukhova@biocad.ru

The study of cross-reactivity of therapeutic drugs based on monoclonal antibodies on human tissues: basic approaches and methodological techniques

T. Y. Ostroukhova, V. A. Ivanov, E. L. Morozova, R. A. Ivanov

Closed joint-stock company «BIOCAD» (CJSC «BIOCAD»), Lyubuchany village, Chekhov district, Moscow region, Russia

Tissue cross-reactivity (TCR) studies are screening immunohistochemical (IHC) assays, usually conducted on frozen human and animal tissues. This study is obligatory for getting the permission for clinical trials in Russia for all innovative therapeutic products based on monoclonal antibodies or antibody-like molecules that contain complementarity-determining region (CDR). In this article are represented approaches and methodical features for successful conduction of tissue cross-reactivity studies with examples from own authors' experience.

Key words: tissue cross-reactivity (TCR) study; monoclonal antibody; immunohistochemical (IHC) assay.

For citation: Ostroukhova TY, Ivanov VA, Morozova EL, Ivanov RA. The study of cross-reactivity of therapeutic drugs based on monoclonal antibodies on human tissues: basic approaches and methodological techniques. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (4): 237–244.

References

1. Medical immunobiological preparations. The organization of production and quality control of monoclonal antibodies. Guidelines. Appendix № 2; MR 3.3.2.2359–08 (in Russian).
2. Rules for studies of biological drugs of the Eurasian Economic Union. 2015 (in Russian).
3. Guideline on Development, Production, Characterization and Specifications for Monoclonal Antibodies and Related Products. Annex I. EMEA; 2009.
4. Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use. Appendix I. FDA; 1997.
5. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. Immunology. Moscow: Logosfera; 2007 (in Russian).
6. Leach MW, Halpern WG, Johnson CW, Rojko JL, MacLachlan TK, Chan CM, Galbreath EJ, Ndifor AM, Blanset DL, Polack E, Cavagnaro JA. Use of Tissue Cross-reactivity Studies in the Development of Antibody-based Biopharmaceuticals: History, Experience, Methodology, and Future Directions. *Journal of Toxicologic Pathology* 2010; 38: 1138–66.
7. Petrovsky BV, ed. Big Medical Encyclopedia. 3rd ed. V. 2. Moscow: Sovetskaya entsiklopedia; 1975 (in Russian).

Authors

Closed joint-stock company «BIOCAD» (CJSC «BIOCAD»), Nauchnaya street 1, Lyubuchany village, Chekhov district, Moscow region 143280, Russian Federation.

Ostroukhova TYu. Head of the laboratory of immunological methods of the Preclinical Studies Department. Candidate of Biological Sciences.

Ivanov VA. Research associate of the Preclinical Studies Department.

Morozova EL. Head of the Department of preclinical trials of drug products.

Ivanov RA. Vice President, Research & Development. Candidate of Medical Sciences.

Определение остаточной ДНК клеток-продуцентов *E. coli* и CHO в субстанциях рекомбинантных белков методом qPCR

Н. Д. Ёлшин

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия

Поступила 12.09.2016 г. Принята к публикации 17.11.2016 г.

Рынок препаратов рекомбинантных белков растет и развивается во всем мире, в том числе и в России. Как продуцент, так и субстанция, должны быть тщательно охарактеризованы и проверены по всем критериям безопасности. Среди обязательных требований, предъявляемых к таким препаратам — содержание остаточной ДНК клеток-продуцентов должно быть не более 10 нг на дозу. Коммерческих наборов для определения остаточной ДНК в мире относительно немного, они основаны на четырех разных методах. В статье представлен краткий обзор этих методов, обозначены их преимущества и недостатки. Общим недостатком всех коммерческих наборов является стоимость. Основными задачами работы было подобрать оптимальный метод выделения ДНК из белковых субстанций и образцов различных этапов очистки белка, отработать определение количества остаточной ДНК *Escherichia coli* и клеток яичника китайского хомяка (CHO) методом количественной полимеразной цепной реакции (qPCR) без использования коммерческих наборов. Статья также содержит ряд практических рекомендаций по особенностям выделения ДНК и хранению стандарта. Целью исследования был поиск достоверного и недорогого метода определения содержания остаточной ДНК клеток-продуцентов в образцах рекомбинантных белков. В статье приводится обзор методов выделения ДНК для анализа, обоснована необходимость выделения ДНК перед анализом, преимущество отдано методу выделения на спин-колонках. Оптимальный метод выделения ДНК для определения ее количества в субстанции такой, при котором выход ДНК стабилен, в том числе и при различных химических составах исследуемых образцов, а в растворе выделенной ДНК отсутствует белок и другие примеси. Предложенный метод выделения ДНК на спин-колонках является наименее трудозатратным, оптимизирован для выделения ДНК из белковых субстанций и образцов различных стадий очистки белков. Самостоятельное приготовление растворов для выделения ДНК является простой процедурой и может снизить затраты на анализ. Представлен отчет об успешной адаптации методик определения остаточной ДНК *E. coli* и CHO методом qPCR с использованием флуоресцентных зондов. Продемонстрирована чувствительность метода не менее 1 пг/мл как при анализе количества остаточной ДНК *E. coli*, так и CHO.

Ключевые слова: определение остаточной ДНК клеток-продуцентов; остаточная ДНК клеток хозяина; qPCR ДНК CHO; qPCR ДНК *E. coli*; выделение ДНК из субстанций рекомбинантных белков.

Библиографическое описание: Ёлшин Н.Д. Определение остаточной ДНК клеток-продуцентов *Escherichia coli* и CHO в субстанциях рекомбинантных белков методом qPCR. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16 (4): 245–252.

1. Введение

1.1. Производство рекомбинантных белков

Производство рекомбинантных белков для терапевтических целей это целая индустрия, которая уже сейчас огромна и в дальнейшем будет только расти.

На данный момент два наиболее популярных продуцента это кишечная палочка (*Escherichia coli*) и клетки яичника китайского хомяка (Chinese hamster ovary, CHO). Эти продуценты хорошо изучены, методики производства различных рекомбинантных белков при помощи этих клеток многократно описаны, контролирующие организации много лет регистрируют и одобряют производство терапевтических белков как в *E. coli*, так и в CHO, поэтому выбор их для работы очевиден [1].

Использование клеточных линий для производства ведет к множеству проблем, связанных с контролем чистоты и безопасности получаемой субстанции, одна из которых — обеспечить минимальное количество остаточной ДНК клеток-продуцентов [2, 3].

ДНК клеток-продуцентов в ходе получения субстанции обычно разрушается на мелкие фрагменты, поэтому сложно предсказать конкретные эффекты от ее наличия в

субстанции. Хотя нет данных о полученных негативных эффектах, связанных с остаточной ДНК в субстанции, есть причины предполагать связанный с ней онкогенный (могут присутствовать такие онкогены, как Ras) и инфекционный (ВИЧ, в случае использования некоторых лентивирусных векторов) потенциал, и потому рассматривать как фактор риска [4, 5]. Остатки геномной ДНК бактерий несут иммуногенный потенциал, в связи с вероятностью остатка неметилированных CpG-регионов. Идея определения остаточной ДНК также позиционируется как демонстрация эффективности очистки белка [6]. Так, в реальности, образцами для анализа количества остаточной ДНК клеток-продуцентов оказываются не только образцы субстанций, но и образцы различных стадий хроматографии белков, получаемые во время отработки методики очистки. Такие образцы могут содержать не только белок в высоких концентрациях, но и различные соли и детергенты.

Контролирующие организации требуют определять количество остаточной ДНК в субстанциях рекомбинантных белков: предельно допустимая концентрация остаточной ДНК по требованиям FDA (Food and Drug Administration): 100 пг на дозу [7], по требованиям ВОЗ — 10 нг на дозу [8]. В отечественной фармакопее рекоменда-

ции по определению остаточной ДНК даны в ОФС 1.7.1.0007.15 тома 2 издания XIII «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», рекомендуемая концентрация совпадает с требованиями ВОЗ, что указано в ОФС.1.7.2.0011.15 «Требования к клеточным культурам — субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов» [9].

1.2. Методы измерения остаточной ДНК

Регулирующими организациями, в том числе и отечественной фармакопеей, рекомендованы три метода для определения остаточной ДНК: гибридизация, метод Threshold®, количественная ПЦР (qPCR, quantitative PCR, real-time PCR) [10]. Полноценных сравнений этих методов в литературе достаточно [6, 11], далее будет представлена только краткая справка о методах.

1.2.1. Гибридизация ДНК. Принцип метода — отжигание специфических меченых проб на иммобилизованной и денатурированной ДНК. В ходе гибридизации двухцепочечную молекулу ДНК нагревают для денатурации и разделения цепей, смешивают с другой денатурированной ДНК, например с флуоресцентно мечеными зондами. При последующем снижении температуры смеси одноцепочечные ДНК в случае комплементарности соединяются, образуя гибридную молекулу. Гибридизация ДНК длительный и трудоемкий процесс.

1.2.2. Threshold total DNA assay system — коммерческий набор фирмы «Molecular Devices Corporation», этот метод более 20 лет используют для определения примеси остаточной ДНК, приобрести набор можно и на момент написания статьи. Реакция многокомпонентна: ДНК связывается одновременно с биотинилированным белком и с антителом, конъюгированным с уреазой. С помощью биотина, связанного со стрептовидином, комплексы концентрируются на биотинилированной мембране, затем добавляется мочевины, и измерение количества ДНК производится по изменению pH при гидролизе мочевины до аммиака и углекислого газа [12]. Метод дорог, низкопроизводителен и трудоемок.

1.2.3. Quant-iT™ PicoGreen®. Коммерческий краситель производства «Molecular Probes, Invitrogen» широко используется для определения ДНК. При определении остаточной ДНК этим методом необходимо учитывать, что, во-первых, ДНК нужно хорошо очистить от белка и других примесей, так как интенсивность свечения красителя сильно зависит не только от наличия белка, но и от примесей (солей, спирта, детергентов и т.д.). Во-вторых, заявленная производителем чувствительность метода — 250 пг/мл (50 пг ДНК в 200 мкл раствора), а динамический диапазон — всего три порядка. В некоторых ситуациях такой чувствительности может быть недостаточно, а динамический диапазон узок в сравнении с qPCR. Данный метод не рекомендован контролирующими организациями для определения остаточной ДНК. Но при этом измерение этим методом максимально быстро, дешево и неспецифично.

1.2.4. qPCR (quantitative polymerase chain reaction). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — данный метод позволяет многократно увеличить количество копий представленной в образце ДНК при наличии необходимых компонентов реакции (нуклеотиды, ДНК-полимеразы, праймеры, буфер) и условий (термоциклирование). За счет увеличения количества копий достигается высокая чувствительность метода. Обратной стороной чувствительности являются нередко встречающиеся проблемы с контамина-

цией [13]. При использовании qPCR для определения ДНК в образцах белковых растворов, ее также придется выделять, так как многие белки и другие возможные компоненты анализируемой субстанции (образца) ингибируют ПЦР.

Коммерческий набор, основанный на использовании реагента PicoGreen, предлагает компания «Cygnus» и «Krishgen». Коммерческие наборы, основанные на qPCR, предлагают также «Cygnus», «ThermoFisher».

Для достоверного определения количества ДНК клеточ-продуктов важно провести качественное выделение ДНК из образца.

1.3. Методы выделения ДНК для последующего анализа

Выделять ДНК из белковой субстанции необходимо, так как некоторые белки даже в низких концентрациях могут ингибировать ПЦР [14], при этом белки существенно различаются по степени ингибирования реакции [15]. Кроме того, в образце могут присутствовать различные компоненты, такие как органические растворители, детергенты, соли, которые также могут повлиять на ход ПЦР.

Последние несколько лет все чаще используют метод «прямой qPCR», т.е. без выделения ДНК из образца, но с «перевариванием» белка прямо в образце [16]. Опубликована работа, где к субстанции белкового препарата добавляли протеиназу К, которая в присутствии SDS (sodium dodecyl sulfate, додецил сульфат натрия) переваривает белок, а также Tween 20 для отмены ингибирующего полимераза эффекта SDS [17]. В статье Hussain M. [18] описано использование только протеазы КАРА, которая, по мнению автора, не обладает ингибирующим эффектом. Такие методы могут рассматриваться перспективными ввиду отсутствия этапа выделения ДНК, невысокой стоимости и быстроты выполнения анализа, но имеют некоторые ограничения, например, по количеству белка в образце.

1.3.1. Переосаждение ДНК. В статье В. Ну с соавт. [19] предложен этот метод для последующей оценки уровня остаточной ДНК. Авторы использовали коммерческий набор для выделения ДНК, основанный на переосаждении на йодиде натрия. Чтобы хорошо очистить осадок ДНК от белка, его необходимо многократно промыть. Авторы предлагали не делать отмывки, положенные по методике коммерческого набора, поскольку «возникали вариации в количестве выделенной ДНК». Данных о чистоте ДНК, выделенной таким образом, в статье не приводится. Также метод переосаждения ДНК для последующего определения ее количества используется в коммерческих наборах компании «Cygnus».

Метод переосаждения ДНК дешев, но с необходимыми отмывками не быстр. Эффективность и успешность переосаждения зависит от компонентов раствора ДНК, встречается много технических проблем в работе с методом, в том числе и при работе с соосаждителем: есть опасность пересушить осадок после отмывки, тогда ДНК плохо растворится, можно недосушить, тогда возникает риск контаминации раствора этанолом, осадок может флотировать, в таком случае сложно отобрать отмывочный раствор, не повредив осадок, иногда осадок оказывается нерастворим.

Для последующего проведения количественного анализа ДНК необходим метод, устойчивый к различным составам образца, при котором количество потерянной при выделении ДНК стабильно не различается в стандартных и исследуемых образцах.

1.3.2. Выделение ДНК на сорбенте с использованием спин-колонок. Данный метод является самым распространенным методом выделения ДНК. ДНК в присутствии высокой концентрации хаотропных ионов сорбируется на носитель (стекло, диоксид кремния) [20], белки и другие компоненты остаются в растворе и фильтруются в собирательную пробирку. Затем ДНК отмывают спиртовым раствором от примесей и хаотропных ионов.

Этот метод самый быстрый и простой. Также этот метод может быть самым дешевым при самостоятельном приготовлении растворов в лаборатории и использовании дешевых спин-колонок. Кроме того, при использовании спин-колонок риск контаминации в процессе выделения минимален. При выделении возможны потери ДНК, однако, не связанные с химическим составом исследуемого на примесь остаточной ДНК образца.

1.3.3. Выделение ДНК на магнитных частицах. Этот более дорогостоящий метод (основанный на том же принципе, что и предыдущий), например, использовали для определения остаточной ДНК Wei Zhang с соавт. [21].

Целью работы являлась разработка оптимального метода выделения ДНК из белковых субстанций и образцов различных стадий очистки белка и последующего достоверного определения остаточной ДНК клеток-продуцентов СНО и *E. coli* методом qPCR без использования коммерческих наборов.

2. Материалы и методы

2.1. Выделение ДНК на сорбенте с использованием спин-колонок

После серии экспериментов был разработан следующий протокол выделения ДНК из белковых растворов (субстанция (образцы) различных стадий очистки белка):

1. Добавить к 100 мкл исследуемого или калибровочного образца 400 мкл сорбционного раствора, перемешать, перенести в спин-колонку.
2. Центрифугировать пробирки при 6000g в течение 1 мин, вылить содержимое собирательной пробирки.
3. Внести на колонку 500 мкл сорбционного раствора. Центрифугировать пробирки при 12000g в течение 1 мин. Вылить содержимое собирательной пробирки.
4. Внести на колонку 500 мкл промывочного раствора. Центрифугировать пробирки при 12000g 3 мин. Вставить колонку в новую пробирку объемом 1,5 мл.
5. Внести в центр колонки 100 мкл элюирующего раствора. Инкубировать 2 мин при комнатной температуре. Центрифугировать пробирки при 6000g в течение 1 мин.

Для выделения ДНК использовались спин-колонки «DSB», кат. № 9012-90-2 (Китай), они могут быть заменены любыми аналогичными спин-колонами.

Состав растворов для выделения остаточной ДНК из белковых субстанций с использованием спин-колонок:

- лизирующий раствор: 100 mM Tris-HCl (pH 6,4), 6 M GuSCN, 20 mM EDTA, 1 % Triton X-100. Используют только для приготовления ДНК-стандарта (п. 2.3);
- сорбционный раствор: 100 mM Tris-HCl (pH 6,4), 6 M GuSCN;
- промывочный раствор: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 25 % изопропанол, 25 % этанол;
- элюирующий раствор: TE буфер или вода;

В коммерческих наборах используется элюирующий раствор следующего состава: 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0 (NaOH);

2.2. qPCR

2.2.1. Реагенты и оборудование. Для qPCR на основе интеркалирующего красителя SYBR использовали реагенты фирмы «Евроген». Готовая смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR, кат. № PK147L. Для qPCR с использованием флуоресцентных зондов использовали следующую смесь для ПЦР в расчете на одну реакцию 25 мкл: HS Taq ДНК полимеразы («Евроген», PK015L), 0,4 мкл; буфер для ПЦР, поставляемый вместе с полимеразой 10×, 2,5 мкл; смесь олигонуклеотидов 2,5 mM каждого, 2 мкл («Sigma», DNTPI00A); вода 8,6 мкл. В реакцию общим объемом 25 мкл вносили 10 мкл раствора ДНК, конечная концентрация праймеров и зондов была 200 нМ. В работе использовали систему определения ПЦР в режиме реального времени Bio-Rad iCycler IQ5 и соответствующее стандартное программное обеспечение. Cq (quantitative cycle; Ct; Threshold cycle) определяли автоматически.

Определение количества белка в анализируемых образцах производили методом с использованием бичинониновой кислоты (BCA, Bicinchoninic acid) — использовали коммерческий набор Pierce BCA Protein Assay (кат. № 23225).

2.2.2. Праймеры и зонды

2.2.2.1. Измерение ДНК СНО методом qPCR. Праймеры и зонды, использованные в работе, приведены в таблице 1 и были заказаны в компании «ДНК-синтез». Для детекции остаточной ДНК СНО использовали уже неоднократно проверенный (по данным литературы) набор олигонуклеотидов, разработанный D. Venable с соавт. [22]. Использовали двухступенчатый протокол ПЦР: после предварительной денатурации 5 мин при 95 °C проводили 40 циклов амплификации: 10 с при 95 °C и 60 с при 53 °C.

2.2.2.2. Измерение ДНК *E. coli* методом qPCR. В оригинальной статье была предложена трехступенчатая программа амплификации, работу проводили по двухступенчатой программе: после предварительной денатурации при 95 °C 2 мин, проводили 40 циклов амплификации: 10 с при 95 °C и 40 с при 56 °C. В процессе отработки методики анализ проводили, как в варианте с SYBR (как предлагалось в оригинальной статье), так и с флуоресцентным зондом. Оригинальный дизайн праймеров: L. D. Нууск с соавт. [11]. Зонд предлагается впервые.

2.3. Стандарт

Стандарт изготавливали накануне работы с исследуемыми образцами, ДНК выделяли из клеток линии продуцента белка, субстанцию или образцы стадий очистки которого планировали анализировать. Отбирали около 10 млн клеток штамма-продуцента, количество клеток определяли с помощью камеры Горяева. В микропробирку помещали 50 мкл клеточной взвеси, прибавляли 450 мкл лизирующего раствора (состав растворов указан в разделе 2.1), тщательно перемешивали на вортексе. Полученный клеточный лизат переносили в спин-колонку, помещенную в собирательную пробирку, и центрифугировали при 6000 g в течение 1 мин. Затем в колонку вносили 500 мкл сорбционного буферного раствора и центрифугировали при 12000 g в течение 1 мин. Содержимое собирательной пробирки отбрасывали. В центр колонки вносили 500 мкл промывочного раствора и центрифугировали при 12000 g в течение 3 мин при комнатной температуре. Содержимое собирательной пробирки отбрасывали. Для элюции в центр колонок вносили 100 мкл воды, инкубировали в те-

чение 2 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 12000g в течение 1 мин.

Концентрацию ДНК штамма-продуцента в полученном элюате определяли спектрофотометрически с учетом удельного показателя поглощения при 260 нм, равного $A_{1\text{см}}^{1\text{мг/мл}} = 20 \text{ о. е.}$

3. Результаты и обсуждение

ПЦР ингибируется белком даже в низких концентрациях, например, таким малым количеством иммуноглобулинов, как 1 мкг/мл (финальная концентрация в ПЦР-смеси), при концентрации 1 мг/мл в пробирке в процессе ПЦР образуется непрозрачный сгусток (в процессе термоциклирования происходит коагуляция белка), при наличии которого невозможна и правильная детекция сигнала. Также ПЦР в разной степени ингибируют органические растворители, детергенты и различные соли.

Требованиями к методу выделения ДНК для определения количества ее в субстанции являются: получение чистой ДНК без примеси белка, стабильный выход ДНК после выделения, устойчивость метода к различным составам образцов для анализа.

Очевидно, что выделяя ДНК методом, неподходящим для выделения из образцов с высоким содержанием белка и возможным наличием различных солей и детергентов, можно получить недостоверные результаты о количестве остаточной ДНК клеток-продуцентов. При этом в большинстве статей, посвященных определению остаточной ДНК клеток-продуцентов, этот момент игнорируется, обычно лишь указывается наименование коммерческого набора для выделения ДНК (обычно из крови).

Например, работая с методом переосаждения ДНК из образцов с высокими концентрациями белков или солей (образцы различных стадий очистки белка), мы столкнулись с целым рядом проблем в процессе выделения ДНК для анализа. Эффективность и успешность переосаждения зависела от компонентов раствора, иногда осадок после переосаждения оказывался нерастворимым, иногда он не формировался. При экспериментах с количеством отмывок не было оптимального варианта: либо из выделенных стандартных образцов не удавалось построить кривую с удовлетворительным коэффициентом линейной зависимости (R^2), либо раствор ДНК содержал примесь белка.

Для получения достоверных результатов содержания ДНК в исследуемых образцах методом qPCR, выделять ДНК нужно обязательно как из исследуемых образцов, так и из калибровочных, чтобы при подсчете концентраций детектируемой ДНК, учесть потери при выделении и избежать возможных искажений результатов, связанных с разными составами растворов стандартных образцов ДНК и исследуемых образцов. При этом процент выхода ДНК при выделении должен быть достоверно одинаковый для всех образцов, и, очевидно, чем выше будет выход, тем выше будет чувствительность. О стабильности выхода ДНК можно говорить при коэффициенте линейной зависимости (R^2) ≥ 0.99 кривой, построенной по данным qPCR, как минимум, 6 стандартных образцов, при нормальной эффективности ПЦР (90–110 %). Чтобы проверить и доказать устойчивость метода к необычному составу экспериментального образца, из которого будет производиться выделение ДНК (высокие концентрации солей, детергентов и т.д.), необходимо дополнительно поставить экспери-

мент с добавлением известного количества ДНК в такой образец.

3.1. Выделение ДНК на сорбенте с использованием спин-колонок

Протокол был составлен на основе метода Boom с соавт. [23]. Была проведена серия экспериментов со сравнением выхода ДНК и ее качества и в классический метод внесено несколько изменений. Из сорбционного буфера был удален предлагаемый авторами Triton X-100, так как его наличие снижало выход и делало его нестабильным. Вероятно, в условиях выделения ДНК из белковой субстанции, а не из клеточной массы, нет нужды в его наличии. По данным литературы Triton X-100 действительно мешает сорбции ДНК [24]. Две отмывки спиртом и одна ацетоном, предложенные в статье, заменены на одну отмывку спиртовым раствором, без последствий для чистоты выделенных образцов.

По нашим данным выход ДНК напрямую связан с колонками: нами сравнивались четыре разных типа колонок. Некоторые спин-колонки, например, прилагаемые к наборам фирмы «Qiagen», позволяют стабильно выделять 100 % ДНК образца, даже если в образце, внесенном на колонку, присутствует лишь 0,1 пг ДНК. Но эти колонки можно приобрести только вместе с дорогостоящим набором. В большинстве экспериментов использовались спин-колонки «DSB» (могут быть заменены любыми аналогичными), которые обеспечивают стабильный выход ДНК на уровне 80 %. На рисунке 1 приводится обычный результат для выделения на таких колонках.

Выбор самих колонок также играет большую роль в затратах на анализ. Затраты на реагенты при выделении по вышеописанной методике составят не более 0,2\$, стоимость ПЦР-смеси на одну реакцию составляет 0,1\$, а цена на спин-колонки — 0,2–0,6\$ за штуку. Хотя и описаны способы регенерации колонок с помощью инкубации в 1 М HCl [25] и с помощью нескольких отмывок Triton X-100 в течение 1 ч [25], эти методы подойдут не каждой лаборатории.

Для определения устойчивости метода был проведен опыт с добавлением известного количества ДНК к растворам белков в высокой концентрации и к хроматографическим буферным растворам, в которых теоретически может быть необходимо оценить количество остаточной ДНК в

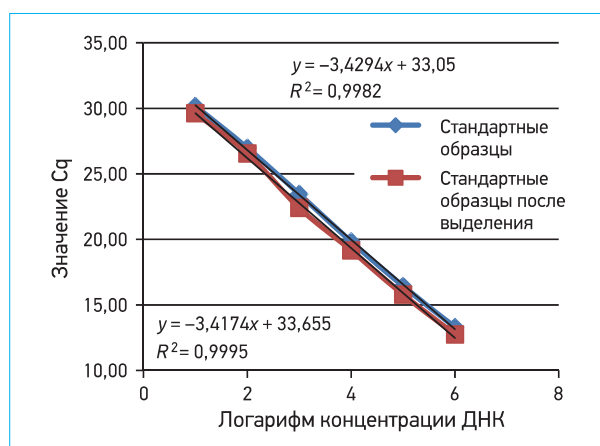


Рис. 1. Стандартные кривые qPCR ДНК CHO в 10-кратных разведениях (с 1 мкг/мл до 10 пг/мл). Представлены кривая qPCR образцов калибровки и кривая qPCR образцов калибровки, прошедших выделение на спин-колонках.

процессе отработки метода очистки. Во всех случаях выделялось одинаковое количество ДНК, — количество, которое было инокулировано в раствор перед экспериментом. Состав буферных растворов, используемых в эксперименте, приведен в таблице 2. Компоненты указанных буферов и высокая концентрация белков не повлияли на качество выделения ДНК. Перед выделением к 90 мкл буферных растворов добавлялось 10 мкл раствора ДНК, т.е. указанные в таблице 2 концентрации солей в растворах снижались, но незначительно.

В растворах элюированной ДНК контролировалось отсутствие белка с помощью набора (2.2.2.1) — метод с использованием бицинониновой кислоты: раствор элюированной ДНК после выделения не содержал белка по результатам данного анализа, не наблюдалось ингибирования ПЦР.

Выделение ДНК предложенным методом дает стабильный выход, что дает возможность строить калибровочные кривые с $R^2 \geq 0,99$.

3.2. Стандарт. Срок хранения ДНК в оптимальных условиях без значительного снижения Cq при проведении qPCR на матрице этой ДНК обычно около 100 сут [26]. На матрице деградирующей ДНК амплификация идет хуже, чем на матрице свежевыделенной, а результаты по поглощению при 260 нм могут совпадать, так как при спектрофотометрии поглощают свет пурины и пиримидины, которые могут быть как в составе молекулы ДНК, так и в виде отдельных нуклеотидов (или разной длины фрагментов ДНК в процессе деградации) [27]. Поэтому, при невозможности приготовления свежей стандартной ДНК непосредственно перед анализом, рекомендуется калибровочную ДНК измерять комбинацией, как минимум, из двух методов: количество оценить спектрофотометрически и (или) методом с использованием интеркалирующих красителей и проконтролировать качество ДНК методом электрофореза.

Для длительного хранения ДНК-стандарта может быть использовано лиофильное высушивание, по некоторым данным это позволяет отсрочить деградацию ДНК [28]. При лиофилизации рекомендуется добавлять в буфер тригалоу для дополнительного увеличения срока хранения ДНК [29].

3.3. СНО qPCR. Праймеры отжигаются на Alu-эквивалентных повторах [30], которых в ДНК СНО около 4000. Тест-система СНО49 оказывается самой чувствительной к ДНК СНО, хотя количество повторов амплифицирующейся последовательности не всегда коррелирует с чувствительностью тест-системы [31]. По данным В. Ну с соавт. [19] в зонде есть критическая замена, но по другим источникам и нашим данным это не подтверждается.

Чувствительность тест-системы 10 фг на реакцию. Эффективность реакции 95 %. Стандартная кривая приведена на рисунке 2, а.

3.4. *E. coli* qPCR. Для детекции остаточной ДНК *E. coli* использовались праймеры, отжигающиеся на гене 16S рибосомы, у некоторых бактерий до 7 копий этого гена [32]. Оригинальный дизайн праймеров: L. D. Нууц с соавт. [11]. Такие же праймеры использовались (без ссылки на указанных выше авторов) в статье Т. N. Farivar с соавт. [33]. Дополнительно к этим праймерам для qPCR с интеркалирующим красителем SYBR green нами был предложен зонд. Чувствительность при работе с зондом соответствует результатам с SYBR green — не менее 1 пг/мл. Последовательность разработанного зонда также внесена в таблицу 1.

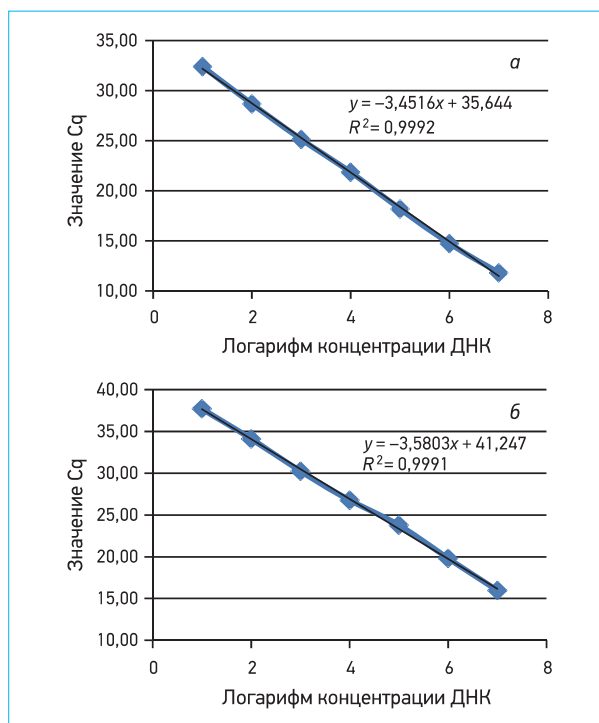


Рис. 2. Стандартная кривая qPCR ДНК в 10-кратных разведениях (с 1 мкг/мл до 1 пг/мл): а — ДНК СНО; б — ДНК *E. coli*.

Таблица 1. Олигонуклеотиды для детекции остаточной ДНК СНО и *E. coli* методом qPCR

CHO HCDNA Primers (5' → 3')	
qCHO49 F	TGGAGAGATGGCTCGAGGTT
qCHO49 R	TGGTTGCTGGGAATTGAAGTC
qCHO49 probe	FAM-AGAGCACCAACTGCTCTTCCAGAGGTCC-BHQ
<i>E. coli</i> HCDNA Primers (5' → 3')	
qColiDNA F	AGAAGCTTGCTCTTTGCTGA
qColiDNA R	CTTTGGTCTTGCGACGTTAT
qColiDNA probe	FAM-ATGCTCTGGGAACTGCCTGATGGA-BHQ

Чувствительность тест-системы 10 фг на реакцию. Эффективность реакции 95 %. Стандартная кривая приведена на рисунке 2, б.

Многие авторы, определяющие остаточную ДНК *E. coli*, сталкивались с проблемой контаминации используемых ПЦР-смесей: в них использовалась рекомбинантная полимераз, полученная из *E. coli* и плохо очищенная от ДНК. Справиться с этой проблемой поможет немало количество советов в литературе [34, 35].

Чувствительность описанных методов достаточна для определения количества остаточной ДНК в субстанции для предоставления такой информации контролирующим органам; выделение ДНК предложенным методом дает стабильный выход, что дает возможность построить калибровочную кривую с $R^2 \geq 0,99$, метод выделения подходит для работы с образцами белковых субстанций и образцов промежуточных стадий очистки белка, за счет самостоятельного приготовленных растворов для выделения ДНК достигается невысокая стоимость анализа.

Таблица 2. Хроматографические буферы и белковые растворы, проверенные на совместимость с методикой выделения ДНК, описанной в данной статье

Буферы для хроматографии	Состав буфера
Ионообменная хроматография	NaHCO ₃ 0,3 М, NaCl 0,5 М, pH 8,6
Гидрофобная хроматография	Фосфатный буфер (Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄) 50 мМ, pH 6,0
	Фосфатный буфер (Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄) 50 мМ pH 6,0 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,3 М
	Фосфатный буфер (Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄) 50 мМ, pH 6,0 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,0 М
Аффинная хроматография	Glycine HCl 0,1 М, pH 2,5
Металл-хелатная	PBS + Imidazole 0,3 М, pH 7,8
	Tris-HCl 50 мМ, pH 7,0
	Цитратный буфер 50 мМ, pH 6,1

Растворы белков

Infliximab (IgG) 49 мг/мл
Omalizumab (IgG) 25 мг/мл
Etanercept 15 мг/мл

4. Заключение и выводы

Таким образом, измерение остаточной ДНК при помощи qPCR является точным, простым и дешевым методом, доступным каждой лаборатории. Выбранные наборы праймеров и зондов обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Выделение ДНК из исследуемого образца перед таким анализом необходимо, предложенный метод выделения оптимизирован специально для обозначенной задачи, быстр, дешев и устойчив, может заменить коммерческие наборы. Отечественной фармакопеей метод ПЦР рекомендован для определения остаточной ДНК в субстанции, метод может быть при необходимости валидирован и включен в фармакопейную статью предприятия.

Литература

- Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2002; 13: 117–23.
- Миронов АН, Меркулов ВА, Сакаева ИВ, Васильев АН, Бунятян НД, Кулес ВГ. и др. Оценка качества биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов рекомбинантной ДНК. В кн.: *Руководство по экспертизе лекарственных средств*. Т. 3. М.: ПОЛИГРАФ-ПЛУС; 2014. С. 4–24.
- Note for Guidance on Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant DNA Technology, 3AB1A. *Production and Quality Control of Medicinal Products derived by recombinant DNA Technology*. 1995. P. 214.
- WHO. WHO Expert Committee on Biological standardization: Highlights of the 46th meeting, October 1996. *WHO Wkly Epidemiol. Rec*. 72, 1997, pp. 141–5.
- Lahijani M, Duhon M, Lusby E, Betita H, Marquet M. Quantitation of host cell DNA contaminate in pharmaceutical-grade plasmid DNA using competitive PCR and enzyme linked immunosorbent assay. *Hum Gene Ther*. 1988; (9): 1173–80.
- Wang X, Morgan DM, Wang G, Mozier NM. *Residual DNA Analysis in Biologics Development: Review of Measurement and Quantitation Technologies and Future Directions*. *Biotechnology & Bioengineering*. Published online 28 September 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). doi 10.1002/bit.23343.
- Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, U. S. A. FDA; 1997.
- Position statement on the use of tumourigenic cells of human origin for the production of biological and biotechnological medicinal products. *Biotechnology Working Party, Committee for Proprietary Medicinal Product, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Evaluation of Medicinal Products for Human Use*, EU. CPMP; 2001.
- Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК. ОФС 1.7.1.0007.15. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 2. С. 536–7. М.; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
- WHO Expert Committee on Biological Standardization, *World Health Organ. Teth. Rep. Ser.* 1998; 878: 1–101.
- Lee DH, Bae JE, Lee JH, Shin JS, Kim IS. Quantitative detection of residual E. coli host cell DNA by real-time PCR. *J Microbiol Biotechnol*. 2010; 20(10): 1463–70.
- Kung VT, Panfili PR, Sheldon EL, King RS, Nagainis PA, Gomez JB, et al. Picogram quantitation of total DNA using DNA-binding proteins in a silicon sensor-based system. *Anal Biochem*. 1990; 187: 220–7.
- Vaneechoutte M, Van Eldere J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J Med Microbiol*. 1997; 46: 188–94.
- Abu Al-Soud W, Jönsson LJ, Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 345–50.
- Abu Al-Soud W, Rådström P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(2): 485–93.
- Peper G, Fankhauser A, Merlin T, Roscic A, Hofmann M, Obrdlík P. Direct real-time quantitative PCR for measurement of host-cell residual DNA in therapeutic proteins. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 100: 123–30.
- Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, Altwegg M. A simple «universal» DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *PCR Methods Appl*. 1995; (4): 368–70.
- Hussain M. A direct qPCR method for residual DNA quantification in monoclonal antibody drugs produced in CHO cells. *J Pharm Biomed Anal*. 2015; 115: 603–6.
- Hu B, Sellers J, Kupeca J, Ngob W, Fentona S, Yanga TY, Grebaniera A. Optimization and validation of DNA extraction and real-time PCR assay for the quantitative measurement of residual host cell DNA in biopharmaceutical products. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 88: 92–5.
- Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1979; 76: 615–9.
- Zhang W, Wu M, Menesale E, Lu T, Magliola A, Bergelson S. Development and qualification of a high sensitivity, high throughput Q-PCR assay for quantitation of residual host cell DNA in purification process intermediate and drug substance samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 100: 145–9.
- Venable D, Miro-Quesada G, Calley J, Monson E, He L. High-throughput and quantitative detection of residual NS0 and CHO host cell genomic DNA. *BioProcess Int*. 2007; (5): 56–61.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; (3): 495–503.
- Siddappa NB, Avinash A, Venkatramanan M, Ranga U. Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. *BioTechniques* 2007; 42: 186–92.
- Röder B, Frühwirth K, Vogl C, Wagner M, Rossmann P. Impact of long-term storage on stability of standard DNA for nucleic acid-based methods. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(11): 4260–2.
- Glaser JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. *BioTechniques* 1995; 18: 62–6.
- Podivinsky E, Love JL, van der Colff L, Samuel L. Effect of storage regime on the stability of DNA used as a calibration standard for real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 2009; 394(1): 132–4.

29. Smith S, Morin P. Optimal storage conditions for highly dilute DNA samples: a role for trehalose as a preserving agent. *J Forensic Sci.* 2006; 51(2): 426–32.
30. Haynes SR, Toomey TP, Leinwand L, Jelinek WR. The Chinese hamster Alu-equivalent sequence: a conserved highly repetitious, interspersed deoxyribonucleic acid sequence in mammals has a structure suggestive of a transposable element. *Molecular Cellular Biology* 1981; 1(7): 573–83.
31. Verardo ML, Carvalho JG, Delgado DN, Kuhns ST. Accuracy and sensitivity of residual DNA detection by qPCR is not predicted by target copy number. *Biotechnology Progress* 2012; 28(2): 428–34.
32. Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1981; 62: 293–300.
33. Farivar TN, Mamnoon B, Arzenani MK, Ilghari D. Novel real time polymerase chain reaction approach for rapid detection of the residual *Escherichia coli* genomic DNA in biopharmaceutical products establishment of real time polymerase chain reaction to detect residual gDNA. *Biotech Health Sci.* 2014; 3(1): 263–75.
34. Silkie SS, Tolcher MP, Nelson KL. Reagent decontamination to eliminate false-positives in *Escherichia coli* qPCR. *J Microbiol Meth.* 2008; 72: 275–82.
35. Kibbee R, Linklater N, Црмeci B. Eliminating false positives in a qPCR assay for the detection of the uidA gene in *Escherichia coli*. *J Water Health* 2013; 11(3): 382–6.

Об авторах

Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства России. Российская Федерация, 197110, Санкт-Петербург, Пудожская ул., 7. Ёлшин Никита Дмитриевич. Младший научный сотрудник лаборатории иммунофармакологии.

Адрес для переписки: Ёлшин Никита Дмитриевич; nikita.yolshin@gmail.com

Detection of residual *E. coli* and CHO host-cell DNA in recombinant proteins by qPCR

N. D. Yolshin

Federal State Unitary Enterprise «Research Institute of Highly Pure Biopreparations» of the Federal Biomedical Agency of the Russian Federation, St Petersburg, Russia

Production of recombinant proteins is a steadily growing industry in Russia and all over the world. Both producer and substance should be properly characterized and tested against all safety criteria. One of the mandatory requirements to the mentioned drugs is the assessment of the content of residual DNA-producing cells, which should be less than 10 ng per dose. There are not many commercial kits for detection of residual DNA and they are based on four different methods. The article provides a brief overview of these methods and highlights their advantages and disadvantages. Common disadvantage of all the commercial kits is their price. The main goal of the research was to choose an optimal method of DNA extraction from protein substances and samples of various protein purification steps, as well as to work over measuring the amount of residual *E. coli* DNA and CHO by qPCR method not using commercial kits. The article also provides with a number of practical recommendations on specific aspects of DNA extraction and reference standard storage. The aim of the study was to find a reliable and inexpensive method for determining residual DNA-producing cells in recombinant protein samples. The article provides with an overview of DNA extraction methods, stipulates the necessity of DNA extraction prior to the analysis. The advantage was given to the method of spin-column extraction. Optimal DNA extraction method for its assay in a substance is the method, which provides with a stable DNA yield, including different chemical structure of the samples, and upon the condition that no protein and other impurities are detected in the isolated DNA solution. The proposed method for DNA spin-column extraction is the least labor-intensive, is optimized for DNA isolation from protein substances and samples of various protein purification steps. Self preparation of solutions for DNA extraction is a simple procedure and can reduce analysis costs. The report on successful adaptation of the methods of residual *E. coli* and CHO DNA detection by qPCR using fluorescent probes was provided. The sensitivity of the method was demonstrated at least 1 pg/ml for the analysis of the amount of residual DNA both for *E. coli* and CHO.

Key words: detection of residual DNA-producing cells; residual host-cell DNA; the DNA qPCR CHO host cell; qPCR *E. coli* host-cell DNA; DNA isolation from protein solutions.

For citation: Yolshin ND. Detection of residual *E. coli* and CHO host-cell DNA in recombinant proteins by qPCR. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (4): 245–252.

References

1. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2002; 13: 117–23.
2. Mironov AN, Merkulov VA, Sakaeva VI, Vasiliev AN, Bunyatyan ND, Kukes VG, et al. Evaluation of the quality of biological drugs derived using recombinant DNA techniques. In: *Guidelines for the examination of medicines. V. 3. Moscow: POLIGRAF-PLUS; 2014. P. 4–24 (in Russian).*
3. Note for Guidance on Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant DNA Technology, 3AB1A. *Production and Quality Control of Medicinal Products derived by recombinant DNA Technology.* 1995. P. 214.
4. WHO. WHO Expert Committee on Biological standardization: Highlights of the 46th meeting, October 1996. *WHO Wkly Epidemiol. Rec.* 72, 1997, pp. 141–5.
5. Lahijani M, Duhon M, Lusby E, Betita H, Marquet M. Quantitation of host cell DNA contaminate in pharmaceutical-grade plasmid DNA using competitive PCR and enzyme linked immunosorbent assay. *Hum Gene Ther.* 1988; (9): 1173–80.
6. Wang X, Morgan DM, Wang G, Mozier NM. Residual DNA Analysis in Biologics Development: Review of Measurement and Quantitation Technologies and Future Directions. *Biotechnology & Bioengineering.* Published online 28 September 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). doi 10.1002/bit.23343.

7. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologicals Evaluation and Research, U. S. A. FDA; 1997.
8. Position statement on the use of tumourigenic cells of human origin for the production of biological and biotechnological medicinal products. Biotechnology Working Party, Committee for Proprietary Medicinal Product, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Evaluation of Medicinal Products for Human Use, EU. CPMP; 2001.
9. Medicines produced using recombinant DNA techniques. General monograph 1.7.1.0007.15. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th edition. V. 2. P. 536–7. Moscow; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
10. WHO Expert Committee on Biological Standardization, World Health Organ. Teth. Rep. Ser. 1998; 878: 1–101.
11. Lee DH, Bae JE, Lee JH, Shin JS, Kim IS. Quantitative detection of residual *E. coli* host cell DNA by real-time PCR. *J Microbiol Biotechnol*. 2010; 20(10): 1463–70.
12. Kung VT, Panfili PR, Sheldon EL, King RS, Nagainis PA, Gomez JB, et al. Picogram quantitation of total DNA using DNA-binding proteins in a silicon sensor-based system. *Anal Biochem*. 1990; 187: 220–7.
13. Vaneechoutte M, Van Eldere J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J Med Microbiol*. 1997; 46: 188–94.
14. Abu Al-Soud W, Jönsson LJ, Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 345–50.
15. Abu Al-Soud W, Rådström P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(2): 485–93.
16. Peper G, Fankhauser A, Merlin T, Roscic A, Hofmann M, Obrdlík P. Direct real-time quantitative PCR for measurement of host-cell residual DNA in therapeutic proteins. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 100: 123–30.
17. Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, Altwegg M. A simple «universal» DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *PCR Methods Appl*. 1995; (4): 368–70.
18. Hussain M. A direct qPCR method for residual DNA quantification in monoclonal antibody drugs produced in CHO cells. *J Pharm Biomed Anal*. 2015; 115: 603–6.
19. Hu B, Sellers J, Kupeca J, Ngob W, Fentona S, Yanga TY, Grebaniera A. Optimization and validation of DNA extraction and real-time PCR assay for the quantitative measurement of residual host cell DNA in biopharmaceutical products. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 88: 92–5.
20. Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1979; 76: 615–9.
21. Zhang W, Wu M, Menesale E, Lu T, Magliola A, Bergelson S. Development and qualification of a high sensitivity, high throughput Q-PCR assay for quantitation of residual host cell DNA in purification process intermediate and drug substance samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 100: 145–9.
22. Venable D, Miro-Quesada G, Calley J, Monson E, He L. High-throughput and quantitative detection of residual NS0 and CHO host cell genomic DNA. *BioProcess Int*. 2007; (5): 56–61.
23. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; (3): 495–503.
25. Siddappa NB, Avinash A, Venkatramanan M, Ranga U. Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. *BioTechniques* 2007; 42: 186–92.
26. Röder B, Frühwirth K, Vogl C, Wagner M, Rossmann P. Impact of long-term storage on stability of standard DNA for nucleic acid-based methods. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(11): 4260–2.
27. Glasel JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* 1995; 18: 62–6.
28. Podivinsky E, Love JL, van der Colff L, Samuel L. Effect of storage regime on the stability of DNA used as a calibration standard for real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 2009; 394(1): 132–4.
29. Smith S, Morin P. Optimal storage conditions for highly dilute DNA samples: a role for trehalose as a preserving agent. *J Forensic Sci*. 2006; 51(2): 426–32.
30. Haynes SR, Toomey TP, Leinwand L, Jelinek WR. The Chinese hamster Alu-equivalent sequence: a conserved highly repetitive, interspersed deoxyribonucleic acid sequence in mammals has a structure suggestive of a transposable element. *Molecular Cellular Biology* 1981; 1(7): 573–83.
31. Verardo ML, Carvalho JG, Delgado DN, Kuhns ST. Accuracy and sensitivity of residual DNA detection by qPCR is not predicted by target copy number. *Biotechnology Progress* 2012; 28(2): 428–34.
32. Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1981; 62: 293–300.
33. Farivar TN, Mamnoon B, Arzenani MK, Ilghari D. Novel real time polymerase chain reaction approach for rapid detection of the residual *Escherichia coli* genomic DNA in biopharmaceutical products establishment of real time polymerase chain reaction to detect residual gDNA. *Biotech Health Sci*. 2014; 3(1): 263–75.
34. Silk SS, Tolcher MP, Nelson KL. Reagent decontamination to eliminate false-positives in *Escherichia coli* qPCR. *J Microbiol Meth*. 2008; 72: 275–82.
35. Kibbee R, Linklater N, Urmeci B. Eliminating false positives in a qPCR assay for the detection of the *uidA* gene in *Escherichia coli*. *J Water Health* 2013; 11(3): 382–6.

Authors

Federal State Unitary Enterprise «Research Institute of Highly Pure Biopreparations» of the Federal Biomedical Agency of the Russian Federation, Pudojskaya street, 7, St Petersburg 197110, Russian Federation.
 Yolshin ND. Junior research scientist of the Immunopharmacology laboratory.

Оценка качества вакцины туляреминой живой по результатам испытаний в рамках обязательной сертификации

И. В. Касина¹, Л. И. Ращепкин², А. А. Горяев¹, С. А. Алексеева¹, Т. И. Немировская¹, А. А. Мовсисянц¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Федеральное казенное учреждение здравоохранения Медико-санитарная часть № 64

Федеральной службы исполнения наказаний, Саратов, Россия

Поступила 19.08.2016 г. Принята к публикации 17.11.2016 г.

В статье представлен анализ результатов испытаний, проведенных в ходе экспертизы качества вакцины туляреминой живой в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в 2011–2015 гг. Из 34 серий вакцины, выпущенных в 2011 г., 14 серий не соответствовали требованиям нормативной документации (НД) по показателям: «Специфическая активность (процент живых микробных клеток)», «Количество накожных доз» и «Термостабильность». Результаты экспериментальных исследований подтвердили нестандартность образцов серий вакцины туляреминой живой по показателям «Специфическая активность (процент живых микробных клеток)», что, соответственно, приводит к различию тестируемых образцов вакцины по количеству накожных и внутрикожных доз. Подтверждено, что FT-агар является питательной средой, обеспечивающей все необходимые условия для культивирования вакцинного штамма *Francisella tularensis*. Анализируются возможные причины нестандартности качества серий, выпущенных в 2011 г. Результаты испытаний 93 серий туляреминой вакцины, произведенных в 2012–2015 гг., показали их полное соответствие требованиям НД. Стабильное обеспечение качества туляреминой вакцины послужило основанием для возможности выбора, аттестации и утверждения новых серий препарата в качестве отраслевых стандартных образцов.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*; вакцина туляреминая живая; нормативная документация; специфическая активность; процент живых микробных клеток; концентрация микробных клеток; количество накожных доз; термостабильность; колониеобразующая единица; отраслевой стандартный образец.

Библиографическое описание: Касина ИВ, Ращепкин ЛИ, Горяев АА, Алексеева СА, Немировская ТИ, Мовсисянц АА. Оценка качества вакцины туляреминой живой по результатам испытаний в рамках обязательной сертификации. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016;16 (4): 253–259.

Туляремия — острое природно-очаговое инфекционное заболевание из группы бактериальных зоонозов, которое вызывается бактерией *Francisella tularensis*, протекающее с интоксикацией, лихорадкой, развитием лимфаденита и поражением различных органов. Относится к группе особо опасных инфекционных болезней, так как возбудитель туляремии является патогенным биологическим агентом (ПБА) II группы. Одной из характерных эпидемиологических особенностей туляремии является почти 100 % восприимчивость к ней человека без различия в возрасте, кроме того, больные люди не представляют опасности для здоровых. В результате перенесенного заболевания формируется стойкий иммунитет [1–5].

Природные очаги туляремии распространены на всех континентах Северного полушария в Европе, Азии и Северной Америке, заболевания людей регистрируются в виде спорадических случаев и эпидемических вспышек [6, 7]. В России туляремия постоянно обнаруживается практически на всей территории [1, 8, 9]. В 90-е годы прошлого века в нашей стране ежегодно диагностировалось от 100 до 400 случаев заболевания людей. В 2000–2011 гг. заболеваемость в России существенно снизилась и составляла 50–123 случаев в год, что не исключает возникновение вспышек, охватывающих несколько сотен человек, как это произошло в 2005 г., и более 1000 — в 2013 г. в результате обострения эпизоотического процесса в природном очаге туляремии [8, 9].

В настоящее время иммунизация является самым надежным способом профилактики туляремии. Для про-

филактики заболевания в России используется туляреминая вакцина, представляющая собой живую культуру вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, лиофилизированного в стабилизирующей среде. Вакцинация рекомендована населению с 7-летнего возраста, проживающему на энзоотических по туляремии территориях, а также по эпидемическим показаниям. Туляреминая вакцина через 20–30 суток после прививки обеспечивает развитие стойкого иммунитета продолжительностью до 5 лет [1, 3]. В Российской Федерации против туляремии ежегодно подлежит вакцинации более 300 тыс. и ревакцинации более 1 млн человек [9]. Соответственно, постоянный контроль качества туляреминой вакцины является неотъемлемой составляющей системы вакцинопрофилактики.

Цель работы — оценка качества вакцины туляреминой живой по результатам сертификационных испытаний в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России за период 2011–2015 гг.

В задачи исследования входило проведение испытаний вакцины туляреминой живой в соответствии с требованиями НД Р N002348/01-010212, анализ полученных результатов и выбор серий вакцины в качестве кандидатов в отраслевые стандартные образцы (ОСО).

Материалы и методы

В Испытательном центре экспертизы качества МИБП проведены испытания 127 серий вакцины туляреминой живой. Серии вакцины, выпущенные в 2011 г., условно обозначены под номерами 1–14, в 2012 г. — под номерами

15–64, в 2013 г. — под номерами 65–75, в 2014 г. — под номерами 76–92, в 2015 г. — под номерами 93–107.

Испытания проводили в строгом соответствии с методами, указанными в НД на лекарственный препарат по показателям: «Описание», «Подлинность», «Время растворения», «рН», «Время седиментационной устойчивости», «Размер частиц», «Потеря в массе при высушивании», «Точность розлива», «Вакуум, герметизация», «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов», «Специфическая безопасность», «Специфическая активность (концентрация микробных клеток; процент живых микробных клеток, степень диссоциации)», «Количество накожных доз», «Прививаемость» и «Термостабильность».

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Одним из основных показателей качества вакцины является «Специфическая активность», обусловленная общей концентрацией микробных клеток и процентом живых микробных клеток. На основании результатов, полученных по данному показателю, определяется количество накожных и внутрикожных доз вакцины в ампуле. Штаммы *F. tularensis* особо требовательны к условиям культивирования, они не растут на питательных средах широкого применения — мясо-пептонных агаре и бульоне, агаре и бульоне Хоттингера. Оптимальными условиями для их культивирования являются слабощелочные агаровые или желточчные среды с добавлением цистеина, кроличьей дефибринированной крови, тканевых экстрактов и других стимуляторов роста [2, 3, 10, 11]. Используемая нами питательная среда для культивирования и выделения туляремийного микроба (FT-агар) изготовлена на основе сернокислотного гидролизата рыбной муки с цистеином, стимулятором роста гемофильных бактерий и глюкозо-витаминной добавкой (глюкоза, тиамин хлорид, кальция пантотенат). FT-агар по ростовым свойствам соответствовал требованиям НД: при посеве 10 м.к. вакцинного штамма *F. tularensis* обеспечивал рост единичных (от 4 до 8) колоний, а при посеве 100 м.к. — от 60 до 80 % от посевной дозы.

При экспертизе качества 34 серий вакцины, выпущенных в 2011 г., у 14 серий были выявлены несоответствия требованиям НД по показателю «Специфическая активность (процент живых микробных клеток)». Содержание живых микробных клеток было ниже нормы (менее 40 % от общего количества). Но при этом по показателю «Специфическая активность (концентрация микробных клеток)» все серии соответствовали требованиям НД (табл. 1).

По показателям качества: «Описание», «Подлинность», «Время растворения», «рН», «Время седиментационной устойчивости», «Размер частиц», «Потеря в массе при высушивании», «Точность розлива», «Вакуум, герметизация», «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов», «Специфическая безопасность», «Прививаемость» и «Термостабильность» все испытываемые серии вакцины соответствовали требованиям НД.

Достоверность полученных результатов несоответствия серий требованиям НД по показателю «Специфическая активность (процент живых микробных клеток)» была подтверждена проведением двукратных испытаний. Как видно из результатов, представленных в таблице 1, в образцах серий вакцины № 1, 2, 5, 6 и 10 содержание живых микробных клеток было недостаточным и не составило су-

щественной разницы в результате повторного испытания (от 18 до 29 %). В сериях вакцины № 12, 13 и 14 выявлены значительные колебания (от 0,2 до 69 %) содержания живых микробных клеток в разных образцах. В сериях № 3, 4, 9 и 11 при низком содержании живых микробных клеток в среднем по трем образцам отмечалась двукратная и более разница между результатами двух испытаний, например, в серии № 11 количество живых микробных клеток в первом испытании составило 23 % и только 1,5 % — во втором испытании. Самое низкое содержание живых микробных клеток обнаружено в образцах серий вакцины № 7 и 8 (от 5 до 10 %) и подтверждено повторными испытаниями. Количество накожных и внутрикожных доз, вводимых людям, является расчетной величиной, зависящей от содержания живых микробных клеток в образце. В связи с отмеченной нестандартностью тестируемых образцов вакцины, количество иммунизирующих доз в них было или недостаточным или значительно превышало норму. В итоге эти серии также не соответствовали требованиям НД по показателю «Количество накожных доз».

Кроме того, из шести серий вакцины, представленных на испытания по всем показателям, в четырех сериях было выявлено несоответствие требованиям НД по показателю «Термостабильность» (табл. 2). Показатель термостабильности — это срок (не менее 7 сут), в течение которого в препарате сохраняется 50 % живых микробных клеток от их первоначального количества после хранения образцов вакцины при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Испытание по показателю «Термостабильность» проводилось по методике определения процента живых микробных клеток после хранения образцов вакцины при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 14 сут. Далее показатель «Термостабильность» препарата в сутках рассчитывался по формуле, в которой учитывается первоначальное среднее количество живых микробных клеток, среднее количество живых микробных клеток после хранения образцов при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и срок хранения — 14 сут. Как видно из результатов, представленных в таблице 2, показатели содержания живых микробных клеток подтверждают нестандартность представленных образцов.

В ходе испытаний также было отмечено отличие внешнего вида некоторых образцов восстановленной вакцины друг от друга: сразу после внесения 0,9 % раствора натрия хлорида в одних образцах суспензия была однородной и равномерно взвешенной, в других наблюдались гелеобразные включения. После перемешивания в течение регламентированного времени растворения в соответствии с НД (3 мин) различия восстановленного препарата нивелировались.

В процессе поиска причин полученных несоответствий нами был проведен ряд дополнительных экспериментальных исследований. В FT-агар в качестве дополнительных стимуляторов роста поочередно вносили: гемолизированную лошадиную кровь до конечной концентрации 5 %; дефибринированную кроличью кровь до конечной концентрации 5 %; увеличивали содержание глюкозы в питательной среде до концентрации 10 % вместо регламентированных 6 %. Однако внесение в среду различных обогащающих добавок не повлияло на результаты испытаний по показателю «Специфическая активность (про-

цент живых микробных клеток)». При сравнительном высеве образцов вакцины на питательные среды, как с дополнительными добавками, так и без них, было получено идентичное количество колониеобразующих единиц (КОЕ). Таким образом, нами было подтверждено, что ФТ-агар является оптимальной питательной средой, обеспечивающей все необходимые условия для культивирования вакцинного штамма *F. tularensis*.

С целью оценки объективности полученных результатов проводились параллельные высевы вакцины из одного образца (объединение содержимого двух ампул) и из одной ампулы в условиях промежуточной прецизионности (двумя сотрудниками), а также высев содержимого одного образца в полном объеме. Результаты, полученные сотрудниками, во всех опытах показали незначительные колебания (от 5 до 12 %), высокую воспроизводимость при повторных испытаниях и подтвердили большой разброс содержания живых микробных клеток (от 4 до 82 %) и накожных доз (от 1 до 82, при норме от 15 до 50) в образцах и ампулах одной серии.

Результаты проведенных нами исследований подтвердили нестандартность серий туляреминой вакцины по показателям «Специфическая активность (процент жи-

вых микробных клеток)», «Количество накожных доз» и «Термостабильность». В итоге из 34 серий вакцины, выпущенных в 2011 г., — 14 серий (41 %) были признаны несоответствующими требованиям НД.

Из вышеизложенного следует, что возможными причинами получения нестандартных серий туляреминой вакцины по показателям «Специфическая активность (процент живых микробных клеток)», «Количество накожных доз» и «Термостабильность» могли послужить нарушения технологии производства в процессе лиофилизации или неравномерное перемешивание вакцины при ее розливе.

Анализируя результаты испытаний 93 серий туляреминой вакцины, выпущенных в 2012–2015 гг., следует отметить, что все серии препарата после первого испытания соответствовали требованиям НД, в том числе и по показателю «Специфическая активность (процент живых микробных клеток)» (табл. 2). В среднем по сериям общая концентрация микробных клеток составила $1,6 \cdot 10^{10}$ при двух стандартных отклонениях 0,4, что соответствовало норме — $(2 \pm 1) \cdot 10^{10}$ м.к./мл. При этом количество живых микробных клеток в них в среднем получилось 49 %, при

Таблица 1. Результаты испытания по показателю «Специфическая активность» вакцины туляреминой живой, выпущенной в 2011 г.

Образцы серий № п/п	Испытание	Общая концентрация м.к./мл ¹ (среднее по трем образцам)	1-й образец (объединение двух ампул)		2-й образец (объединение двух ампул)		3-й образец (объединение двух ампул)		% ж.м.к. ² (средний по трем образцам)
			% ж.м.к. ²	Кол-во накожных доз ³	% ж.м.к. ²	Кол-во накожных доз ³	% ж.м.к. ²	Кол-во накожных доз ³	
1	1	$1,77 \cdot 10^{10}$	21	18	19	17	13	12	17,5
	2	$1,77 \cdot 10^{10}$	34	30	34	30	19	16	29
2	1	$1,6 \cdot 10^{10}$	24	19	29	23	26	20	26
	2	$1,7 \cdot 10^{10}$	12	10	34	28	25	21	24
3	1	$1,8 \cdot 10^{10}$	30	28	29	26	29	26	29,4
	2	$1,77 \cdot 10^{10}$	8,5	7	3	3	1,5	1	4
4	1	$1,9 \cdot 10^{10}$	30	30	26	25	26	25	27,4
	2	$1,9 \cdot 10^{10}$	11	11	9	9	15	14	12
5	1	$1,7 \cdot 10^{10}$	25	22	22	19	24	21	23,5
	2	$1,7 \cdot 10^{10}$	25	21	20	17	17	14	20,6
6	1	$1,7 \cdot 10^{10}$	10	8	20	17	23	20	18
	2	$1,7 \cdot 10^{10}$	15	12	17	15	17	15	16
7	1	$1,7 \cdot 10^{10}$	10	8	13	11	8	6	10,2
	2	$1,77 \cdot 10^{10}$	11	9	7	6	10	8	9
8	1	$1,8 \cdot 10^{10}$	10	9	7	6	6	5	7
	2	$1,96 \cdot 10^{10}$	4	3	3	3	7	6	5
9	1	$1,33 \cdot 10^{10}$	11	7	8	5	16	11	11
	2	$1,33 \cdot 10^{10}$	11	7	17	11	32	21	20
10	1	$1,1 \cdot 10^{10}$	23	12	15	8	32	16	23,3
	2	$1,2 \cdot 10^{10}$	1	1	35	28	24	13	20
11	1	$1,3640 \cdot 10^{10}$	25	17	15	10	29	19	23
	2	$1,43 \cdot 10^{10}$	2	2	2	1	1	1	1,5
12	1	$1,8 \cdot 10^{10}$	19	19	26	22	46	42	31
	2	$2,2 \cdot 10^{10}$	69	80	1	1	1	1	24
13	1	$1,67 \cdot 10^{10}$	61	48	1,5	1	12	10	26
	2	$1,5 \cdot 10^{10}$	48	40	30	21	0,2	0,3	26
14	1	$1,67 \cdot 10^{10}$	33	25	9,4	8	0,6	1	14,3
	2	$1,7 \cdot 10^{10}$	1	1	33	28	51	43	28,2

¹ Норма: $(2 \pm 1) \cdot 10^{10}$ м.к./мл.

² Процент живых микробных клеток (% ж.м.к.) (норма: не менее 40 %).

³ Количество накожных доз (норма: от 15 до 50).

Таблица 2. Результаты испытания по показателю «Термостабильность» вакцины туляремийной живой, выпущенной в 2011 г.

Образцы серий № п/п	Общая концентрация м.к./мл ¹ (среднее по трем образцам)	% ж.м.к. ² 1-й образец (объединение двух ампул)	% ж.м.к. ² 2-й образец (объединение двух ампул)	% ж.м.к. ² 3-й образец (объединение двух ампул)	% ж.м.к. ² (средний по трем образцам)	Показатель «Термостабильность», сут ³
1	1,5·10 ¹⁰	2	1	6	3	4,2
2	1,5·10 ¹⁰	4	5	3	4	5
3	1,1·10 ¹⁰	0	0	1	1	1,3
4	2,0·10 ¹⁰	2	1	1	1	3

¹ Норма: (2±1)·10¹⁰ м.к./мл.² Процент живых микробных клеток (% ж.м.к.).³ Норма: не менее 7 сут.**Таблица 3.** Результаты испытания по показателю «Специфическая активность» вакцины туляремийной живой, выпущенной в 2012–2015 гг.

Образцы серий № п/п	Общая концентрация м.к./мл ¹ (среднее по трем образцам)	% ж.м.к. ² (средний по трем образцам)	Образцы серий № п/п	Общая концентрация м.к./мл ¹ (среднее по трем образцам)	% ж.м.к. ² (средний по трем образцам)	Образцы серий № п/п	Общая концентрация м.к./мл ¹ (среднее по трем образцам)	% ж.м.к. ² (средний по трем образцам)
15	2,0·10 ¹⁰	62	46	1,9·10 ¹⁰	59	77	1,55·10 ¹⁰	50
16	1,3·10 ¹⁰	50	47	1,8·10 ¹⁰	54	78	1,52·10 ¹⁰	46
17	1,8·10 ¹⁰	49	48	1,7·10 ¹⁰	43	79	1,5·10 ¹⁰	43
18	1,6·10 ¹⁰	42	49	1,8·10 ¹⁰	46	80	1,5·10 ¹⁰	43
19	1,4·10 ¹⁰	47	50	1,8·10 ¹⁰	51	81	1,6·10 ¹⁰	49
20	1,4·10 ¹⁰	52	51	1,9·10 ¹⁰	54	82	1,5·10 ¹⁰	42
21	1,7·10 ¹⁰	53	52	1,9·10 ¹⁰	45	83	1,6·10 ¹⁰	44
22	1,6·10 ¹⁰	62	53	1,8·10 ¹⁰	43	84	1,8·10 ¹⁰	44
23	1,6·10 ¹⁰	51	54	1,6·10 ¹⁰	52	85	2,0·10 ¹⁰	43
24	1,7·10 ¹⁰	47	55	1,6·10 ¹⁰	44	86	1,6·10 ¹⁰	45
25	1,8·10 ¹⁰	47	56	1,6·10 ¹⁰	49	87	1,5·10 ¹⁰	51
26	1,3·10 ¹⁰	46	57	1,9·10 ¹⁰	55	88	1,3·10 ¹⁰	43
27	1,6·10 ¹⁰	42	58	1,8·10 ¹⁰	50	89	1,3·10 ¹⁰	45
28	1,3·10 ¹⁰	53	59	2,0·10 ¹⁰	52	90	1,4·10 ¹⁰	50
29	1,4·10 ¹⁰	41	60	1,5·10 ¹⁰	54	91	1,5·10 ¹⁰	47
30	1,8·10 ¹⁰	51	61	1,6·10 ¹⁰	62	92	1,3·10 ¹⁰	47
31	1,8·10 ¹⁰	54	62	1,5·10 ¹⁰	50	93	1,0·10 ¹⁰	49
32	1,9·10 ¹⁰	45	63	1,5·10 ¹⁰	48	94	1,6·10 ¹⁰	47
33	1,8·10 ¹⁰	41	64	1,3·10 ¹⁰	49	95	1,6·10 ¹⁰	46
34	1,7·10 ¹⁰	44	65	1,5·10 ¹⁰	54	96	1,7·10 ¹⁰	43
35	1,7·10 ¹⁰	46	66	1,5·10 ¹⁰	54	97	1,2·10 ¹⁰	44
36	2,1·10 ¹⁰	44	67	1,7·10 ¹⁰	54	98	1,2·10 ¹⁰	50
37	2,0·10 ¹⁰	60	68	1,5·10 ¹⁰	48	99	1,2·10 ¹⁰	44
38	2,0·10 ¹⁰	51	69	1,7·10 ¹⁰	57	100	1,4·10 ¹⁰	50
39	1,5·10 ¹⁰	53	70	1,5·10 ¹⁰	51	101	1,5·10 ¹⁰	49
40	1,7·10 ¹⁰	59	71	1,5·10 ¹⁰	48	102	1,9·10 ¹⁰	47
41	1,5·10 ¹⁰	48	72	1,8·10 ¹⁰	58	103	1,4·10 ¹⁰	63
42	2,0·10 ¹⁰	42	73	1,6·10 ¹⁰	52	104	1,5·10 ¹⁰	43
43	2,2·10 ¹⁰	43	74	1,7·10 ¹⁰	54	105	1,3·10 ¹⁰	55
44	1,6·10 ¹⁰	52	75	1,6·10 ¹⁰	43	106	1,5·10 ¹⁰	65
45	1,8·10 ¹⁰	43	76	1,57·10 ¹⁰	42	107	1,5·10 ¹⁰	43

¹ Норма: (2±1)·10¹⁰ м.к./мл.² Процент живых микробных клеток (% ж.м.к.) (норма: не менее 40 %).

Таблица 4. Результаты испытания по показателю «Термостабильность» вакцины туляреминой живой, выпущенной в 2012–2015 гг.

Образцы серий № п, п	Общая концентрация м.к./мл ¹ (среднее по трем образцам)	% ж.м.к. ² 1-й образец (объединение двух ампул)	% ж.м.к. ² 2-й образец (объединение двух ампул)	% ж.м.к. ² 3-й образец (объединение двух ампул)	% ж.м.к. ² (по трем образцам)	Показатель «Термостабильность», сут ³
1	1,5·10 ¹⁰	24	26	20	23	15
2	1,3·10 ¹⁰	23	20	22	21	8
3	1,2·10 ¹⁰	37	32	17	29	15
4	1,6·10 ¹⁰	16	23	25	21	9
5	1,8·10 ¹⁰	16	15	17	16	8
6	1,5·10 ¹⁰	16	20	24	20	11
7	1,3·10 ¹⁰	21	20	19	20	7
8	1,5·10 ¹⁰	29	27	24	27	10
9	1,3·10 ¹⁰	31	25	30	28	13
10	1,4·10 ¹⁰	37	26	21	28	10
11	1,3·10 ¹⁰	38	31	24	31	15
12	1,3·10 ¹⁰	26	19	31	25	12
13	1,4·10 ¹⁰	16	12	15	14	8
14	1,5·10 ¹⁰	25	30	26	27	14
15	1,3·10 ¹⁰	14	16	15	15	7
16	1,2·10 ¹⁰	24	18	16	20	9
17	1,2·10 ¹⁰	28	26	29	28	12
18	1,3·10 ¹⁰	14	15	15	15	7
19	1,3·10 ¹⁰	14	15	14	14	8

¹ Норма: (2±1)·10¹⁰ м.к./мл.² Процент живых микробных клеток (% ж.м.к.).³ Норма: не менее 7 сут.

стандартном отклонении 5,6 %, двух стандартных отклонениях 11,2 %, что также соответствовало норме — не менее 40 %. Особенно важно отметить, что колебания количества живых микробных клеток в образцах одной серии были в пределах 10–15 %, что соответствовало допустимым изменениям (не более 20 %). Соответствие образцов серий по содержанию живых микробных клеток свидетельствует об их соответствии требованиям НД по показателю «Количество накожных доз». Содержание прививочных доз в них находилось в пределах нормы — от 15 до 50. Результаты наших испытаний по этим показателям практически совпали с паспортными данными представленных серий от производителя. В ходе испытаний было также отмечено, что после внесения 0,9 % раствора натрия хлорида в ампулу, вакцина полностью растворялась в течение 1 мин при встряхивании, суспензия была однородной и равномерно взвешенной. Из 19 серий вакцины, представленных на испытания по всем показателям, показатель «Термостабильность» также находился в пределах нормы (от 7 до 15 сут), что подтверждает стандартность образцов по количеству живых микробных клеток (табл. 4).

Стабильное обеспечение стандартности качества туляреминой вакцины по показателям «Специфическая активность (процент живых микробных клеток)», «Количество накожных доз» и «Термостабильность» послужило основанием для возможности выбора, аттестации и утверждения новых серий препарата в качестве отраслевых стандартных образцов в 2014 г. (ОСО 42-28-398–2014) и в 2016 г. (ОСО 42-28-398–2016). Основной аттестованной характеристикой ОСО туляреминой вакцины является показатель «Специфическая активность (концентрация микробных клеток; процент живых микробных клеток)» [12]. Аттестованное значение стандартного образца вакцины

(ОСО 42-28-398–2014) по показателю «Специфическая активность (процент живых микробных клеток)» при доверительной вероятности 0,95 составило (54,0±11,7) %, а ОСО 42-28-398–2016 — (46,0±5,8) %.

Выводы

1. За период с 2011 по 2015 г. в Испытательном центре экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России были проведены испытания 127 серий вакцины туляреминой живой, представленных с целью подтверждения их качества на соответствие требованиям НД.

2. Результаты испытаний позволили сделать вывод о нестандартности образцов серий вакцины, выпущенных в 2011 г., что могло быть обусловлено нарушениями технологии производства. Предположительно причиной могли стать нарушения технологии производства в процессе лиофилизации или неравномерное перемешивание вакцины при ее розливе.

3. Серии туляреминой вакцины, выпущенные в 2012–2015 гг., соответствовали требованиям НД по всем показателям, включая показатели: «Специфическая активность (процент живых микробных клеток)», «Количество накожных доз» и «Термостабильность».

4. Проведен выбор серий препарата для аттестации в качестве отраслевого стандартного образца в 2014 г. (ОСО 42-28-398–2014) и в 2016 г. (ОСО 42-28-398–2016).

Литература

1. Олсуфьев НГ, Дунаева ТН. Природная очаговость. Эпидемиология и профилактика туляремии. М.; 1970.
2. Олсуфьев НГ. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.; 1975.

3. Мещерякова ИС. Таксономия, идентификация и иммунологическая диагностика туляремии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 1990.
4. Harik NS. Tularemia: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Pediatric Annals* 2013; 42(7): 288–92.
5. Sjöstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Annals NY Acad Sci.* 2007; 1105: 1–29.
6. WHO Guidelines on Tularaemia. WHO/CDS/EPR/2007.7 [Internet]. 2007 [cited 2013 Feb 12]. Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_EPR_2007_7.pdf.
7. Tularemia — United States, 2001–2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013; 62(47): 963–6.
8. Косилко СА, Балахонев СВ, Бренёва НВ, Чеснокова МВ, Андаев ЕИ, Носков АК и др. Эпидемиологическая ситуация по зоонозным, природно-очаговым инфекционным болезням в Сибири и на Дальнем Востоке в 2013 г. и прогноз на 2014 г. *Проблемы особо опасных инфекций* 2014; (2): 53–7.
9. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2014. Available from: http://rospotrebnadzor.ru/bitrix/redirect.php?event1=file&event2=download&event3=gd_2013_dlya-sayta.pdf&goto=/upload/iblock/3b8/gd_2013_dlya-sayta.pdf.
10. Поздеев ОК. Медицинская микробиология. М.; 2004.
11. Методические указания «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней». МУК 4.2.2939–11. М.; 2011.
12. Касина ИВ, Горяев АА, Рашепкин ЛИ, Фадейкина ОВ, Немировская ТИ, Устинникова ОБ и др. Аттестация и продление срока годности новой серии отраслевого стандартного образца специфической активности и иммуногенности вакцины туляреминой живой. *Биопрепараты* 2015; (4): 32–8.

Об авторах

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

Касина Ирина Владимировна. Ведущий эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Горяев Артем Анатольевич. Заместитель начальника управления экспертизы противобактериальных МИБП, канд. биол. наук.

Алексеева Светлана Александровна. Эксперт 1-й категории лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Немировская Татьяна Ивановна. Начальник лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Мовсесянц Арташес Авакович. Начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Медико-санитарная часть № 64 Федеральной службы исполнения наказаний. Российская Федерация, 410028, г. Саратов, ул. Рабочая, 18.

Рашепкин Леонид Иванович. Начальник бактериологической лаборатории по диагностике туберкулеза филиала «Туберкулезная больница».

Адрес для переписки: Касина Ирина Владимировна; Kasina@expmed.ru

Live tularemia vaccine quality assessment according to test results under the mandatory certification

I. V. Kasina¹, L. I. Raschepkin², A. A. Goryaev¹, S. A. Alekseeva¹, T. I. Nemirovskaya¹, A. A. Movsesyants¹

¹ Federal State Budgetary Institution

«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»

of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

² Federal Government Healthcare Institution Medical Unit № 64

of the Federal Service for Corrections, Saratov, Russia

The results of the tests for the quality assessment of live tularemia vaccine under the Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation in 2011–2015 were analyzed in the present article. There were 14 batches (of 34) which did not comply with the requirements of regulatory documents (RD) in terms of «Specific activity (percentage of live microbial cells)», «Number of cutaneous doses» and «Thermal stability». The experimental results had confirmed the irregularity of tularemia vaccine batch samples in terms of «Specific activity (percentage of live microbial cells)» which, respectively, led to differences in vaccine samples in terms of the number of cutaneous and intradermal doses. It was confirmed that FT-agar is a nutrient providing all the necessary conditions for cultivating *Francisella tularensis* strain. Possible causes of irregular quality of the batches released in 2011 was considered in the present article. Test results for 93 batches of tularemia vaccine manufactured in 2012–2015 shown their full compliance with the requirements of RD. Consistent quality assurance of tularemia vaccine became the basis for the possibility of choice, certification and approval of new drug batches as industrial reference standards.

Key words: *Francisella tularensis*; live tularemia vaccine; regulatory documents; specific activity; percentage of live microbial cells; concentration of microbial cells; number of cutaneous doses; thermal stability; colony forming unit; growth media for cultivation and isolation of tularemia microbe (FT-agar); industry reference standard.

For citation: Kasina IV, Raschepkin LI, Goryaev AA, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI, Movsesyants AA. Live tularemia vaccine quality assessment according to test results under the mandatory certification. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (4): 253–259.

References

1. Olsufiev NG, Dunaeva TN. *Natural foci. Epidemiology and prevention of tularemia*. Moscow; 1970 (in Russian).
2. Olsufiev NG. *Taxonomy, microbiology and laboratory diagnosis of tularemia pathogen*. Moscow; 1975 (in Russian).
3. Mescheryakova IS. *Taxonomy, identification and immunological diagnosis of tularemia*. Dr. Med. Sci [thesis]. Moscow; 1990 (in Russian).
4. Harik NS. *Tularemia: epidemiology, diagnosis, and treatment*. *Pediatric Annals* 2013; 42(7): 288–92.
5. Sjöstedt A. *Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations*. *Annals NY Acad Sci*. 2007; 1105: 1–29.
6. WHO Guidelines on Tularemia. WHO/CDS/EPR/2007.7 [Internet]. 2007 [cited 2013 Feb 12]. Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_EPR_2007_7.pdf.
7. *Tularemia — United States, 2001–2010*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013; 62(47): 963–6.
8. Kosilko SA, Balakhonov SV, Breneva NV, Chesnokova MV, Andaev EI, Noskov AK, et al. *Epidemiological situation on zoonotic and natural-focal infectious diseases in Siberia and Far East in 2013; prognosis for 2014*. *Problemy osobo opasnyh infektsiy* 2014; (2): 53–7 (in Russian).
9. *On the status of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2013: State Report*. Moscow: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare; 2014. Available from: http://rospotrebnadzor.ru/bitrix/redirect.php?event1=file&event2=download&event3=gd_2013_dlya-sayta.pdf&goto=/upload/iblock/3b8/gd_2013_dlya-sayta.pdf (in Russian).
10. Pozdeev OK. *Medical Microbiology*. Moscow; 2004 (in Russian).
11. *Guidelines «Procedure for organizing and conducting tularemia laboratory diagnostics laboratory territorial, regional and federal levels»*. MUK 4.2.2939–11. Moscow; 2011 (in Russian).
12. Kasina IV, Goryaev AA, Rashchepkin LI, Fadeykina OV, Nemirovskaya TI, Ustinnikova OB, et al. *Certification and shelf-life extension of a new batch of the branch reference standard for live tularemia vaccine's specific activity and immunogenicity*. *Biopreparation* 2015; (4): 32–8 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Kasina IV. Leading expert of Laboratory of bacterial vaccines of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Goryaev AA. Deputy head of Office for expertise of antibacterial medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Alekseeva SA. 1st professional category expert of Laboratory of bacterial vaccines of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Nemirovskaya TI. Head of Laboratory of bacterial vaccines of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Medical Sciences.

Movsesyants AA. Head of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Federal State Health Agency Health Service № 64 of the Federal Penitentiary Service of Russia, Rabochaya street 18, Saratov 410028, Russian Federation.

Rashchepkin LI. Head of the bacteriological laboratory for the diagnosis of tuberculosis of the branch «Tuberculosis Hospital».

Разработка и аттестация отраслевого стандартного образца для оценки подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной

М. В. Абрамцева, Т. И. Немировская, О. Б. Устинникова, О. В. Фадейкина,
Р. А. Волкова, А. А. Мовсесянц

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 16.08.2016 г. Принята к публикации 17.11.2016 г.

Представлены материалы по разработке и аттестации отраслевого стандартного образца (ОСО) вакцины менингококковой группы А полисахаридной для оценки качества серий вакцины по показателю «Подлинность». Разработана программа и методика аттестации ОСО. Образцы вакцины — кандидата в ОСО были испытаны по показателям: «Описание», «Время растворения», «Прозрачность восстановленного раствора», «Цветность восстановленного раствора», «Механические включения», «Потеря в массе при высушивании», «Точность розлива», «Фосфор», «Стерильность», «Пирогенность», «Аномальная токсичность», что подтвердило их соответствие требованиям действующей Фармакопейной статьи предприятия (ФСП) ЛС-00392–180512. Определена аттестуемая характеристика: ОСО должен тормозить реакцию пассивной гемагглютинации (РТПГА) в гомологичной «А» системе в диапазоне концентрации полисахарида от 0,19 до 0,39 мкг в 1 мл при отсутствии тормозящего эффекта в гетерологичной «С» системе в концентрации полисахарида 50 мкг в 1 мл. Срок годности ОСО подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной установлен по сроку годности вакцины и составляет 2 года. Утвержден пакет нормативных документов на научно-техническую продукцию ОСО 42–28–428–2014 подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной (паспорт, маркировка макет этикетки первичной упаковки и инструкция по применению).

Ключевые слова: стандартный образец (СО); отраслевой стандартный образец (ОСО); вакцина менингококковой группы А полисахаридная; подлинность.

Библиографическое описание: Абрамцева МВ, Немировская ТИ, Устинникова ОБ, Фадейкина ОВ, Волкова РА, Мовсесянц АА. Разработка и аттестация отраслевого стандартного образца для оценки подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (4): 260–263.

Менингококковая инфекция (МИ) — острое инфекционное заболевание, вызываемое менингококком *Neisseria meningitidis*. Менингококковая инфекция распространена повсеместно и отличается тяжелым течением, неблагоприятными исходами при неадекватной терапии. В Российской Федерации среди причин менингококковой инфекции лидирующее место занимает менингококк серогруппы А. Так, в Москве на долю заболеваний, обусловленных менингококком серогруппы А, приходится около 70,0 %. Показатель летальности от генерализованных форм инфекции составляет 12,5 % [1].

Наиболее действенная мера борьбы с МИ — специфическая вакцинация. В Российской Федерации в настоящее время осуществляется производственный выпуск вакцины менингококковой группы А полисахаридной, которая по всем показателям качества отвечает требованиям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Европейской фармакопеи (ЕФ) [2, 3]. В практике отечественного здравоохранения вакцина применяется с 1981 г. для профилактики генерализованных форм менингококковой инфекции у детей от 1 года, подростков и взрослых и с целью экстренной профилактики в очагах инфекции, вызванной менингококком серогруппы А [1].

В Российской Федерации показанием к профилактической иммунизации с помощью вакцины менингококковой группы А полисахаридной является повышенная заболеваемость (20 на 100 000 населения и более) в пред-

шествующем или текущем году [4]. Прививки против менингококковой инфекции включены в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям [5].

Технология производства вакцины менингококковой группы А полисахаридной в Российской Федерации за последние годы претерпела значительное усовершенствование: было изменено место производства, а также были внесены изменения в методы контроля ряда показателей качества [1].

Одним из наиболее важных критериев оценки качества вакцины менингококковой группы А полисахаридной является определение показателя «Подлинность».

Согласно требованиям действующей Фармакопейной статьи предприятия (ФСП), подлинность вакцины менингококковой группы А полисахаридной и субстанции для ее приготовления оценивается полуколичественным методом в реакции торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА). При этом вакцина должна тормозить реакцию пассивной гемагглютинации в гомологичной «А» системе (сыворотка диагностическая менингококковая серогруппы А, диагностикум эритроцитарный менингококковый серогруппы А) в концентрации не выше 0,4 мкг полисахарида в 1 мл при отсутствии тормозящего эффекта в гетерологичной «С» системе (сыворотка диагностическая менингококковая серогруппы С, диагностикум эритроцитарный менингококковый серогруппы С) в концентрации полиса-

харида 50 мкг в 1 мл [6]. Указанный метод не всегда обеспечивает получение достоверных результатов, особенно при использовании его микромодификации. Большое значение при постановке данной реакции имеет качество используемых реагентов: диагностических сывороток и эритроцитарных диагностикумов. В связи с этим для оценки стабильности получаемых результатов возникает необходимость в разработке стандартного образца (СО) [1].

СО, в том числе категории «отраслевые», выполняют важную роль в системе производства и обеспечения качества иммунобиологических лекарственных препаратов. Их используют в качестве эталона для оценки величин биологических показателей и стандартизации методов контроля готовой продукции [7–10].

ОСО подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной предназначен для контроля стабильности результатов определения подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной методом РТПГА.

В связи с тем, что в настоящее время в отечественной и мировой практике производства и контроля вакцин отсутствует СО подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной, его разработка и аттестация являются актуальной задачей.

Цель настоящего исследования — разработка и аттестация отраслевого стандартного образца подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной в соответствии с руководящими документами по СО [11–13].

Порядок разработки стандартного образца предусматривает:

- разработку программы аттестации ОСО;
- проведение испытаний по подтверждению соответствия образцов кандидата в ОСО требованиям действующей ФСП на вакцину;
- установление значения аттестуемой характеристики;
- определение срока годности;
- разработку проекта нормативных документов (паспорт, макет этикетки первичной упаковки, инструкция по применению стандартного образца подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной).

Материалы и методы

Материалы

В качестве кандидата в ОСО была использована серия вакцины менингококковой группы А полисахаридной, выпущенная 03.2013 г. Серия была испытана в соответствии с действующей ФСП ЛС-00392–180512 по всем показателям качества и рекомендована для испытания и аттестации.

В работе использовали наборы реагентов «Диагностикум эритроцитарный менингококковый полисахаридный группы А, жидкий» и «Диагностикум эритроцитарный менингококковый полисахаридный группы С, жидкий», ООО «Био-Диагностика», ТУ 9388-004-68925985–10.

Методы

Определение подлинности кандидата в ОСО проводили в соответствии с действующей ФСП в РТПГА.

Постановка реакции РТПГА проводилась в 2 этапа:

1. Определение рабочего разведения менингококковых диагностических сывороток, входящих в состав наборов «Диагностикум эритроцитарный менингококковый полисахаридный группы А, жидкий» и «Диагностикум

эритроцитарный менингококковый полисахаридный группы С, жидкий».

2. Постановка РТПГА с использованием кандидата в ОСО.

Определение рабочего разведения сывороток проводили в соответствии с требованиями нормативной документации ФСП (ЛС-000302-180512) в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА). Для постановки реакции готовили двукратные разведения менингококковых сывороток серогрупп А и С в 0,9 % растворе натрия хлорида в объеме 50 мкл, начиная с разведения сывороток 1:10. В каждую из лунок с разведениями сывороток прибавляли по 25 мкл гомологичного диагностикума. Планшеты встряхивали и оставляли на два часа при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Обязательным контролем является проверка отсутствия спонтанной агглютинации диагностикума, для чего в две лунки, содержащие по 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида, добавляли по 25 мкл диагностикума серогруппы А и в две лунки — диагностикума серогруппы С.

Учет результатов по определению рабочих разведений сывороток проводили по четырехкестной системе. Последнее разведение сывороток, в котором наблюдается агглютинация почти всех эритроцитов с малозаметным кольцом из осевших неагглютинированных эритроцитов, является титром сыворотки. Предыдущее разведение используется в качестве рабочего разведения сыворотки.

Реакцию РТПГА проводили в параллельных опытах с использованием кандидата в ОСО. Для постановки РТПГА в полистироловых планшетах готовили два ряда двукратных разведений кандидата в ОСО в 0,9 % растворе натрия хлорида, начиная с 50 мкг в 1 мл. Начальную концентрацию устанавливали путем определения содержания количества полисахарида серогруппы А в образцах кандидата в ОСО. Содержание полисахарида определяется расчетным путем по содержанию фосфора. В каждую лунку первого ряда добавляли рабочее разведение сыворотки менингококковой серогруппы А в объеме 25 мкл, а в каждую лунку второго ряда — сыворотки менингококковой серогруппы С. Затем в каждую лунку добавляли по 25 мкл соответствующего диагностикума. Планшеты встряхивали и оставляли на два часа при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Учет результатов РТПГА: учитывали ярко выраженный осадок неагглютинированных эритроцитов, который может быть оценен не менее чем на +++.

Результаты и обсуждение

Образцы кандидата в ОСО подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной были испытаны в соответствии с действующей ФСП ЛС-00392-180512 по показателям: «Описание», «Время растворения», «Прозрачность восстановленного раствора», «Цветность восстановленного раствора», «Механические включения», «Потеря в массе при высушивании», «Точность розлива», «Фосфор», «Стерильность», «Пирогенность», «Аномальная токсичность». Образцы кандидата в ОСО соответствуют требованиям ФСП ЛС-00392-180512 по всем исследованным показателям.

Исследуемый кандидат в ОСО предназначен для контроля стабильности определения подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной методом РТПГА. В соответствии с разработанной программой атте-

станции ОСО, проведены испытания 10 образцов серии кандидата в ОСО по показателю «Подлинность». В 6 из 10 проведенных испытаний торможение реакции пассивной гемагглютинации происходило в концентрации полисахарида 0,39 мкг/мл, а в 4 испытаниях — 0,19 мкг/мл. В результате проведенных исследований было определено, что кандидат в ОСО подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной тормозит реакцию пассивной гемагглютинации с гомологичной сывороткой в диапазоне концентраций полисахарида от 0,19 до 0,39 мкг/мл. Тормозящий эффект с гетерологичной сывороткой в концентрации полисахарида 50 мкг/мл отсутствует.

Результаты аттестации образцов кандидата в ОСО подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной дали основание рекомендовать его в качестве отраслевого стандартного образца (ОСО). Образцу присвоен номер ОСО 42-28-428-2014. Оформлен паспорт на научно-техническую продукцию.

Разработаны и утверждены в установленном порядке макет этикетки первичной упаковки, инструкция по применению ОСО подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной.

Срок годности аттестованного ОСО подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной, установленный на основании исследования стабильности вакцины, составляет 2 года (по ФСП на вакцину).

Выводы

1. Проведена разработка и аттестация ОСО подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной.
2. Образцы кандидата в ОСО соответствуют требованиям ФСП ЛС-00392-180512 по всем исследованным показателям.
3. По результатам исследований определено значение аттестованной характеристики: ОСО должен тормозить реакцию пассивной гемагглютинации (РТПГА) в гомологичной «А» системе в диапазоне концентрации полисахарида от 0,19 до 0,39 мкг в 1 мл при отсутствии тормозящего эффекта в гетерологичной «С» системе в концентрации полисахарида 50 мкг в 1 мл.
4. Результаты аттестации образцов кандидата в ОСО дали основание рекомендовать его в качестве ОСО.
5. Утвержден пакет нормативных документов на научно-техническую продукцию ОСО 42-28-428-2014 подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной (паспорт, макет этикетки первичной упаковки и инструкция по применению).

Об авторах

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

Абрамцева Марина Витальевна. Ведущий эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Немировская Татьяна Ивановна. Начальник лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Устинникова Ольга Борисовна. Начальник лаборатории биохимии МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Фадеевская Ольга Васильевна. Главный технолог Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р биол. наук.

Мовсесянц Арташес Авакович. Начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Абрамцева Марина Витальевна; Abramtceva@expmed.ru

ридной (паспорт, макет этикетки первичной упаковки и инструкция по применению).

6. Установленный срок годности аттестованного ОСО подлинности вакцины составляет 2 года.

Литература

1. Немировская ТИ, Абрамцева МВ, Тарасов АП, Мовсесянц АА. Разработка метода оценки показателя «Подлинность» вакцины менингококковой группы А полисахаридной с помощью ИФА. *Биопрепараты* 2013; (2): 39–43.
2. WHO technical reports series № 658. Geneva; 1981.
3. European Pharmacopoeia 7.0.
4. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения «Вакцина менингококковая группы А полисахаридная».
5. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.2.2512-09 «Профилактика менингококковой инфекции».
6. ФСП ЛС-00392-180512 «Вакцина менингококковая группы А полисахаридная».
7. Гайдарова ЛА, Никитина ТН, Фадеевская ОВ, Байкова МЛ, Устинникова ОВ, Климов ВИ, Шведов ДВ. Аттестация отраслевого стандартного образца активности лейкоцитарного интерферона альфа типа. *Биопрепараты* 2014; (2): 31–6.
8. Борисевич ИВ, Петухов ВГ, Мовсесянц АА, Волкова РА, Фадеевская ОВ, Устинникова ОВ и др. Стандартные образцы для контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов. В кн.: *Вакцинология-2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней Тезисы всероссийской научно-практической конференции*. С. 27–8.
9. Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Климов ВИ, Шемерянкина ТБ, Яшкур ВА, Бармин АВ. Современные подходы к разработке стандартных образцов для оценки качества фармацевтических субстанций. *Хим-фарм журн.* 2015; 49(11): 54–6.
10. Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Волкова Р. А., Климов ВИ, Шемерянкина ТБ, Яшкур ВА. Фармакопейные стандартные образцы и практика их применения в отечественной системе стандартизации лекарственных средств. *Хим-фарм журн.* 2016; 50(4): 40–3.
11. ГОСТ 8.315-97 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения. М.: Издательство стандартов; 2004.
12. ГОСТ 8.894-2010 (ISO Guide 35:2006, MOD). Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы материалов (веществ). Общие и статистические принципы определения метрологических характеристик стандартных образцов. М.: Стандартинформ; 2012.
13. ISO Guide 35 Reference Materials. General and statistical principles for certifications. Available from: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=39269.

The development and certification of the industrial reference standard for identification of meningococcal polysaccharide vaccine group A

M. V. Abramtseva, T. I. Nemirovskaya, O. B. Ustinnikova, O. V. Fadeykina, R. A. Volkova, A. A. Movsesyants

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The article highlights the materials on the development and certification of the industrial reference standard (IRS) for identification of meningococcal polysaccharide vaccine group A. The scheme and methodology for IRS certification have been developed. Samples of the vaccine IRS candidate have been tested in terms of: «Description», «Dissolution time», «Transparency of reconstituted solution», «Colourity of reconstituted solution», «Particulate matter», «Loss on drying», «Accuracy of filling», «Phosphorus», «Sterility», «Pyrogenicity», «Abnormal toxicity», confirming their compliance with the current Pharmacopoeia monograph MP-00392-180512. The certified characteristic has been determined: IRS should slow down passive hemagglutination (PHIA) in «A» homologous system with polysaccharide concentration in the range from 0.19 to 0.39 µg per 1 ml in the absence of the inhibitory effect in «C» heterologous system with polysaccharide concentration of 50 µg per 1 ml. The shelf life of the IRS meningococcal group A polysaccharide vaccine for identification has been set against the vaccine shelf life and has been equal to 2 years. The set of regulatory documents on the scientific and technical product IRS 42-28-428-2014 IRS meningococcal group A polysaccharide vaccine for identification (certificate, draft label of primary package and patient information leaflet) has been approved.

Key words: reference standard (RS); industrial reference standard (IRS); meningococcal polysaccharide vaccine group A; identity.

For citation: Abramtseva MV, Nemirovskaya TI, Ustinnikova OB, Fadeykina OV, Volkova RA, Movsesyants AA. The development and certification of the industrial reference standard for identification of meningococcal polysaccharide vaccine group A. *Genotyping problems of microorganisms. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (4): 260–263.

References

1. Nemirovskaya TI, Abramtseva MV, Tarasov AP, Movsesyants AA. Development of identification assessment method for meningococcal group A polysaccharide vaccine by ELISA. *Biopreparaty* 2013; (2): 39–43 (in Russian).
2. WHO technical reports series № 658. Geneva; 1981.
3. European Pharmacopoeia 7.0.
4. Instructions for use of the preparation for medical use «Vaccine meningococcal of group A polysaccharide» (in Russian).
5. Sanitary epidemiological rules SP 3.1.2.2512-09 «Prevention of meningococcal infection» (in Russian).
6. FSP LS-00392-180512 «Vaccine Meningococcal group A polysaccharide» (in Russian).
7. Gaiderova LA, Nikitina TN, Fadeikina OV, Baikova ML, Ustinnikova OB, Klimov VI, Shvedov DV. Evaluation of branch reference standard of leucocyte interferon alpha activity. *Biopreparaty* 2014; (2): 31–6 (in Russian).
8. Borisevich IV, Petukhov VG, Movsesyants AA, Volkova RA, Fadeikina OV, Ustinnikova OV, et al. Reference materials for quality control of medical immunobiological preparations. In: *Vaccinology-2010. Improving immunobiological means of prevention, diagnosis and treatment of infectious diseases Abstracts of All-Russian scientific-practical conference*. P. 27–8 (in Russian).
9. Merkulov VA, Sakanyan EI, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkir VA, Barmin AV. Modern approaches to development of reference substances for evaluation of the quality of pharmaceuticals. *Pharmaceuticals Chemistry J.* 2015; 49(11): 54–6.
10. Merkulov VA, Sakanyan EI, Volkova RA, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkir VA. Pharmacopoeia standard samples and their practical application in the national drug standardization system. *Pharmaceuticals Chemistry J.* 2016; 50(4): 258–61.
11. GOST 8.315-97 State system for ensuring the uniformity of measurements. Standard samples of structure and properties of substances and materials. The main provisions. Moscow: Izdatelstvo standartov; 2004 (in Russian).
12. GOST 8.894-2010 (ISO Guide 35:2006, MOD). State system for ensuring the uniformity of measurements. Standard samples of materials (substances). General and statistical principles for determining the metrological characteristics of reference materials. Moscow: Standartinform; 2012 (in Russian).
13. ISO Guide 35 Reference Materials. General and statistical principles for certifications. Available from: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=39269.

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Abramtseva MV. Leading expert of Laboratory of bacterial vaccines of Test Centre for Quality Expertise of medical immunobiological preparations.

Nemirovskaya TI. Head of Laboratory of bacterial vaccines of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Medical Sciences.

Ustinnikova OB. Head of Laboratory of Biochemistry of medical immunobiological preparations of Test Centre for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Fadeikina OV. Chief technologist of Test Centre for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Volkova RA. Head of the Laboratory of molecular biology and genetic testing methods of Test Centre for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Doctor of Biological Sciences.

Movsesyants AA. Head of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.



НИКОЛАЙ ВАСИЛЬЕВИЧ МЕДУНИЦЫН (к 85-летию со дня рождения)

NIKOLAY VASILIEVICH MEDUNITSYN (on the 85th anniversary)

19 октября 2016 года исполнилось 85 лет ведущему иммунологу страны, доктору медицинских наук, профессору, академику РАН Николаю Васильевичу Медуницыну.

Н. В. Медуницын родился 19 октября 1931 г. в городе Архангельске, свою юность провел в селе Черевково Архангельской области. В 1955 г. окончил педиатрический факультет 2-го Московского медицинского института, а в 1958 г. — аспирантуру при кафедре патологической физиологии этого же института. В 1960 г. Н. В. Медуницын защитил кандидатскую диссертацию, в 1970 г. — докторскую. В 1999 г. был избран членом-корреспондентом РАМН по специальности «Вакцинология», в 2004 г. — академиком РАМН по той же специальности. С 2013 г. — академик РАН.

Свою научную деятельность Н. В. Медуницын начал еще будучи студентом 3-го курса института, затем работал младшим и старшим научным сотрудником во вновь созданной научной аллергологической лаборатории АМН СССР под руководством академика А. Д. Адо, участвуя, таким образом, в становлении отечественной аллергологической службы.

В 1969 г. Н. В. Медуницын был назначен заместителем директора по научной работе Московского НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, в 1979 г. — заместителем директора по научной работе во вновь созданном Институте иммунологии АМН СССР.

Начиная с 1988 г. Н. В. Медуницын в течение 21 года руководил Государственным НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича, на который были возложены функции Национального органа контроля МИБП. С 2009 года Н. В. Медуницын — главный научный сотрудник этого же института.

С 2011 г. в связи с реорганизацией ГИСК им. Л. А. Тарасевича Н. В. Медуницын работал главным научным сотрудником Центра планирования и координации НИР ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, а с 2015 г. по настоящее время он является руководителем научного направления ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Кандидатская диссертация Н. В. Медуницына посвящена барьерной функции лимфатических узлов, способности лимфоузлов задерживать чужеродные частицы и антигены. В докторской диссертации на модели транзиторной аллергии изучены закономерности перехода повышенной чувствительности замедленного типа в немедленную аллергию и образование антител.

Николай Васильевич Медуницын — ведущий специалист в области иммунологии и инициатор создания новой медицинской специальности — вакцинологии. Он автор более 450 научных работ, трех изданий книги «Вакцинология» (1999, 2004, 2010), 8 монографий, в том числе «Mediators of immune response» (1988), имеет семь авторских свидетельств и патентов, соавтор ряда методик получения новых препаратов, а также нормативных документов, методических рекомендаций, указаний и санитарных правил по производству и контролю биологических препаратов. Под руководством Н. В. Медуницына защищена 21 диссертация, в том числе пять докторских.

В научно-исследовательских лабораториях, руководителем которых много лет был Н. В. Медуницын, показана важная роль продуктов генов главного комплекса гистосовместимости в межклеточном взаимодействии между макрофагами и лимфоцитами в процессе формирования гиперчувствительности замедленного типа в условиях *in vitro*. Кроме того, в вирусных вакцинах, получаемых с использованием клеток млекопитающих, обнаружены провоспалительные цитокины (ФНО-альфа, ИЛ-1, ИЛ-6), изучено адъювантное действие цитокинов на иммуногенную активность вакцин против гепатитов А и В, бешенства и клещевого энцефалита.

В своих научных работах, начиная с первой его работы — «Индивидуализация вакцинации» (2000), Н. В. Медуницын выдвинул и обосновал основные положения персонализации в области вакцинопрофилактики. Принципы персонализации заключаются в анализе характера специфического приобретенного иммунитета до вакцинации и последующей коррекции развития иммунитета, прежде всего, в группах повышенного риска. С помощью

персонализации можно достичь более эффективного персонального и коллективного иммунитета, уменьшить побочное действие вакцин и решить некоторые этические проблемы вакцинации. Персонализация вакцинации является вполне реальной и не требует больших финансовых затрат.

Академик Н. В. Медуницын в течение многих лет являлся экспертом ВОЗ, длительное время был членом Комитета биологической стандартизации ВОЗ, основателем и первым главным редактором журналов «Иммунология» и «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Сейчас он член диссертационного совета при НИИ имму-

нологии и член редколлегий ряда научных журналов, в том числе журналов «Иммунология», «Эпидемиология и вакцинопрофилактика», «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» и др.

Н. В. Медуницын награжден орденом Почета (2007 г.), медалями «За заслуги перед отечественным здравоохранением» (2001 г.), «В память 850-летия Москвы» (1997 г.), дипломами премии РАМН имени В. Д. Тимакова и Академии медико-технических наук имени Е. И. Смирнова. В 1999 г. ему присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации».



АНДРЕЙ РУДОЛЬФОВИЧ ВОЛГИН (к 55-летию со дня рождения)

ANDREY RUDOL'FOVICH VOLGIN (on the 55th anniversary)

9 ноября 2016 г. исполнилось 55 лет со дня рождения Заслуженного врача Российской Федерации, кандидата медицинских наук Андрея Рудольфовича Волгина.

А. Р. Волгин родился в 1961 г. в г. Хабаровске. Окончив среднюю школу в г. Владимире в 1978 г., он поступил в Ивановский медицинский институт, а затем перевелся на Военно-медицинский факультет при Горьковском медицинском институте. После окончания с отличием Военно-медицинского факультета в 1984 г. А. Р. Волгин был направлен для дальнейшего прохождения службы в Группу Советских войск в Германии. С 1984 по 1989 гг. он проходил службу на должности врача-токсиколога-радиолога отдельного медицинского батальона (г. Наумбург, ГДР), а затем начальником медицинского пункта отдельной зенитно-ракетной бригады (г. Гота и г. Мюльхаузен, ГДР).

В 1989 г. А. Р. Волгин был переведен в Приволжско-Уральский военный округ, где до 1994 г. последовательно проходил службу на должностях начальника медицинской службы отдельного батальона ликвидации последствий аварий на ядерных энергетических установках (г. Верхняя Пышма Свердловской области), заместителя и начальника медицинской службы учебной дивизии (п/я Еланский Свердловской области), начальника гарнизонного санитарно-эпидемиологического отряда (г. Челябинск).

После окончания с отличием факультета руководящего медицинского состава Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (г. Санкт-Петербург, 1994–1997 гг.) А. Р. Волгин был направлен в Главный центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора Минобороны России (г. Москва), где служил на должностях начальников отделения, организационно-методического отдела и эпидемиологической лаборатории, а в 2006 г. был назначен начальником Главного центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора Минобороны России – заместителем Главного государственного санитарного врача Минобороны России.

В 2000 г. А. Р. Волгину присвоено воинское звание полковник медицинской службы. В 2008 г. он защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а в 2010 г. ему присвоено звание «Заслуженный врач Российской Федерации».

В 2010 г. после увольнения из Вооруженных Сил Российской Федерации А. Р. Волгин назначен заместителем директора ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Минздравсоцразвития России, а в апреле 2011 г. переведен на должность заместителя директора Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Андрей Рудольфович Волгин — высококвалифицированный специалист в области противозидемической защиты личного состава Вооруженных Сил и населения. Он лично организовывал и проводил санитарно-противозидемические (профилактические) мероприятия среди военнослужащих и населения: в контртеррористической операции и операции по поддержанию конституционного правопорядка в Северо-Кавказском регионе России (1999–2005 гг.), в миротворческой операции в Косово Республики Югославия (2001–2002 гг.), в гуманитарной операции по ликвидации медицинских последствий стихийного бедствия (цунами) в Республике Индонезия (2005 г.), в очагах инфекционных заболеваний на всей территории России от Камчатки до Калининградской области. По вопросам международного военного сотрудничества А. Р. Волгин принимал участие в работе делегаций Минобороны России в 5 зарубежных государствах. Лично и в соавторстве он опубликовал более 90 научных работ, в том числе семь руководств и две методические рекомендации.

А. Р. Волгин награжден орденом «За военные заслуги», медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени, 10 медалями и знаками отличия министерств Российской Федерации и иностранных государств, лауреат международной премии в области медицины, индустрии здоровья и сохранения среды обитания человека «Профессия — жизнь» в номинации «Выдающаяся миссия врачей» (2005 г.).