

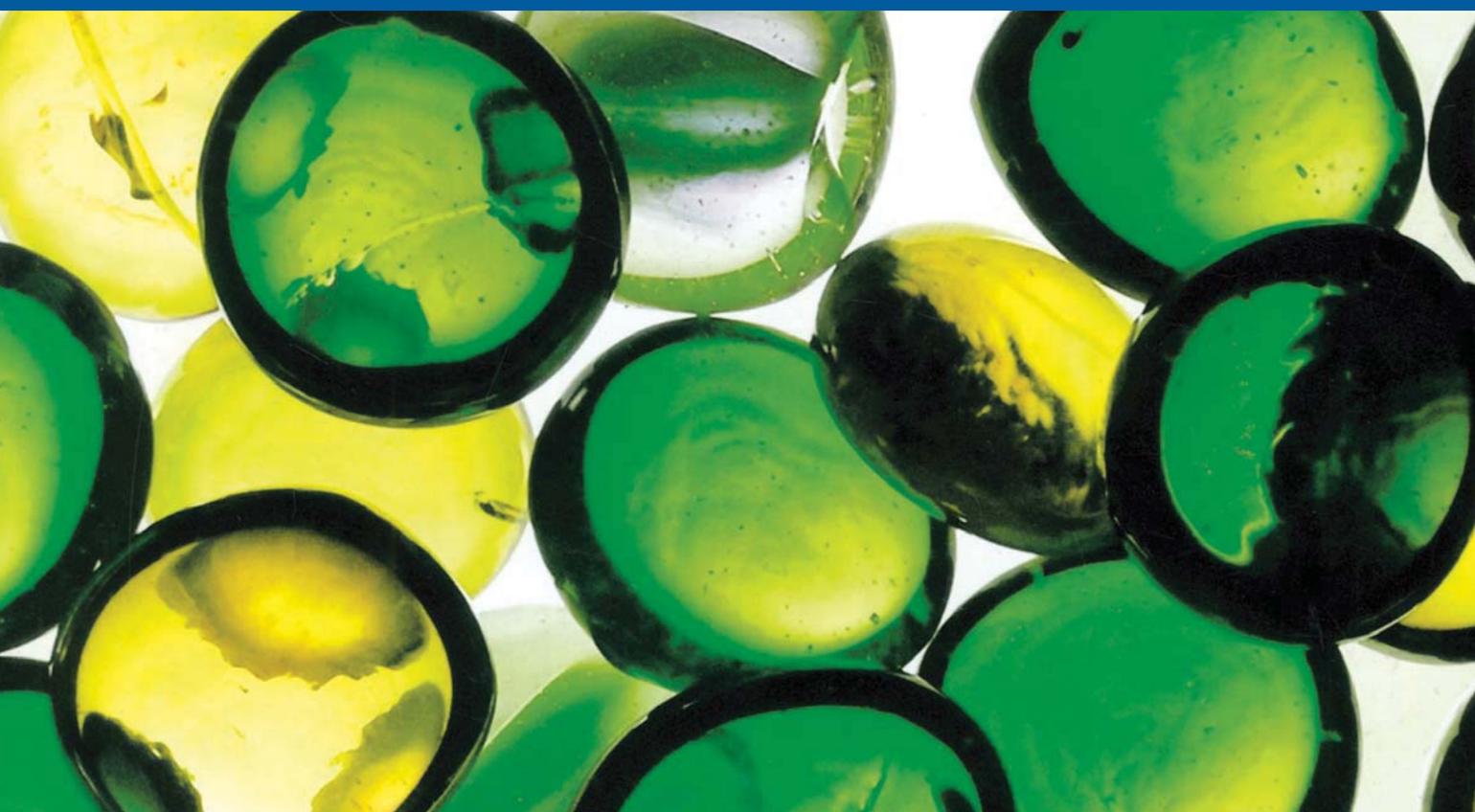
ISSN 2221-996X (Print)
ISSN 2619-1156 (Online)

БИО ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

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

Том 20, № 1
Январь – март 2020



Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment

В НОМЕРЕ

Вспышка нового инфекционного заболевания COVID-19:
β-коронавирусы как угроза глобальному здравоохранению

Интернализация рекомбинантной имиглюцеразы в перитонеальные макрофаги мыши
и фибробласты мыши линии L929

Включен в наукометрическую базу данных Science Index
on-line версия журнала www.biopreparations.ru

Архив журнала размещен в российских и международных реферативных и индексных базах данных: Chemical Abstracts (CAS), Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), КиберЛенинка, Российская государственная библиотека, Академия Google (Google Scholar) и др.

Пятилетний импакт-фактор РИНЦ — 0,462.

К публикации принимаются статьи, подготовленные в соответствии с правилами для авторов, размещенными на сайте журнала www.biopreparations.ru.

Все статьи проходят рецензирование не менее чем двумя рецензентами.

Используется модель двойного слепого рецензирования.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается.

Ускоренная публикация не допускается.

Материалы заочных конференций не публикуются.

Воспроизведение или использование другим способом любой части издания без ссылки на журнал является незаконным и влечет за собой ответственность, установленную действующим законодательством Российской Федерации.

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

БИО ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

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

Том 20, № 1
Январь — март 2020

БИОpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie
[БИОpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]

Peer-reviewed scientific and practical journal of
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Volume 20, No. 1
January — March 2020

«БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» — журнал ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Создан в 2001 г. как периодическое научное издание Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л. А. Тарасевича. В журнале публикуются статьи по вопросам разработки, стандартизации, контроля качества, производства, регистрации и применения биологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов; профилактики, диагностики и лечения инфекционных, аллергических и иммунопатологических процессов; разработки, совершенствования и применения новых технологий с целью получения медицинских биологических препаратов.

В журнале публикуются обзорные и оригинальные статьи, область исследований которых соответствует медицинской и биологической отраслям науки и научным специальностям: **03.01.00 Физико-химическая биология** (03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 03.01.07 Молекулярная генетика, 03.01.08 Биоинженерия); **14.01.00 Клиническая медицина** (14.01.08 Педиатрия, 14.01.09 Инфекционные болезни, 14.01.16 Фтизиатрия); **14.03.00 Медико-биологические науки** (14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология, 14.03.07 Химиотерапия и антибиотики, 14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология, 14.03.10 Клиническая лабораторная диагностика).



Л. А. Тарасевич

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «ЦСП» Минздрава России (Москва, Россия)

Воробьева Мая Сергеевна, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия)

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

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

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

Игнатъев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф., ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Москва, Россия)

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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

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

Чумаков Константин Михайлович, д-р биол. наук, Центр оценки и изучения биологических препаратов, FDA (Силвер-Спринг, Мэриленд, США)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКТОР ПЕРЕВОДА

Губарева Ольга Николаевна, канд. филол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

Львов Дмитрий Константинович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Медуницын Николай Васильевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Михайлов Михаил Иванович, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва, Россия)

Покровский Валентин Иванович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва, Россия)

Савченко Валерий Григорьевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Учайкин Василий Федорович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, Ассоциация педиатров-инфекционистов (Москва, Россия)

Хайтов Рахим Мусаевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Москва, Россия)

НАУЧНЫЕ РЕДАКТОРЫ

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

Лебединская Елена Владимировна, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКТОР

Шестакова Алина Павловна, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment is a journal published by the Federal State Budgetary Institution Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation. It was founded in 2001 as a scientific journal of L. A. Tarasevich State Scientific Research Institute for Standardisation and Control of Biological Products. The journal covers such issues as development, standardisation, quality control, production, authorisation, and use of biological products and biomedical cell products; prevention, diagnosis, and treatment of infectious diseases, allergic diseases, and immunopathological conditions; development, improvement, and use of new technologies for the production of biological products.

The journal publishes original research articles and reviews pertaining to biological and medical areas of research and one of the following specialist fields: **03.01.00 Physicochemical biology** (03.01.06 Biotechnology (including bionanotechnology), 03.01.07 Molecular genetics, 03.01.08 Bioengineering); **14.01.00 Clinical Medicine** (14.01.08 Pediatrics, 14.01.09 Infectious diseases, 14.01.16 Phthiology); **14.03.00 Medical and Life Sciences** (14.03.06 Pharmacology, clinical pharmacology, 14.03.07 Chemotherapy and antibiotics, 14.03.09 Clinical immunology, allergology, 14.03.10 Clinical pathology).

EDITOR-IN-CHIEF

Yuri V. Olefir, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate,
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITORS-IN-CHIEF

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

Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

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

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

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

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Centre for Strategic Planning (Moscow, Russia)

Maya S. Vorobieva, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Ilya V. Darmov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

Sergey Kh. Degtyarev, Dr. Sci. (Biol.), Prof., SibEnzyme Ltd (Novosibirsk, Russia)

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

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Chumakov FSC R&D IBP RAS (Moscow, Russia)

Diana T. Levi, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

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

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

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

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., International Biotechnology Center «Generium» (Volginsky, Vladimir Oblast, Russia)

Konstantin M. Chumakov, Dr. Sci. (Biol.), PhD, Center for Biologics Evaluation and Research, FDA (Silver Spring, Maryland, USA)

EXECUTIVE EDITOR

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

TRANSLATION EDITOR

Olga N. Gubareva, Cand. Sci. (Philology), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

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

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

Aleksandr L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya FRCM (Moscow, Russia)

Ivan A. Dyatlov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, FBIS SRCAMB (Obolensk, Moscow Oblast, Russia)

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

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

Dmitry K. Lvov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya FRCM (Moscow, Russia)

Nikolay V. Medunitsyn, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Mikhail I. Mikhaylov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of RAS, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russia)

Valentin I. Pokrovsky, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Central Research Institute for Epidemiology (Moscow, Russia)

Valery G. Savchenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia)

Vasily F. Uchaykin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Association of Pediatric Infectiologists of Russia (Moscow, Russia)

Rakhim M. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia (Moscow, Russia)

SCIENCE EDITORS

Olga Yu. Goyalova, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

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

EDITOR

Alina P. Shestakova, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Вспышка нового инфекционного заболевания COVID-19: β-коронавирусы как угроза глобальному здравоохранению

Д. В. Горенков, Л. М. Хантимирова, В. А. Шевцов, А. В. Рукавишников, В. А. Меркулов, Ю. В. Олефир . . . 6

Иммунный ответ при иммунизации противовирусными вакцинами

Н. А. Алпатова, Ж. И. Авдеева, Л. А. Гайдерова, С. Л. Лысикова, Н. В. Медуницын . . . 21

Аспекты клинических исследований препаратов для лечения гемофилии

Ж. И. Авдеева, А. А. Солдатов, В. П. Бондарев, В. А. Меркулов . . . 30

Оригинальные статьи

Интернализация рекомбинантной имиглюцеразы в перитонеальные макрофаги мыши и фибробласты мыши линии L929

И. В. Лягоскин, М. С. Пантюшенко, О. М. Стрижакова, Н. К. Кудина, Е. Ю. Прудникова, П. В. Чичканова, С. Г. Аббасова . . . 42

Свойства гетерологичного иммуноглобулина против лихорадки Эбола после длительного хранения

С. А. Мельников, И. В. Борисевич, Е. В. Рождественский, В. Б. Пантюхов, Н. К. Черникова, Е. В. Гордеев, С. А. Нимирская, А. Л. Хмелев, С. И. Сыромятникова, И. В. Шатохина, Т. М. Плеханова, Г. Д. Тиманькова, С. В. Борисевич, Д. А. Кутаев, Л. Ф. Стомба, Е. Ю. Мишалова . . . 50

Защита мышей от заражения вирусом гриппа птиц субтипа H7 с помощью иммунизации рекомбинантным аденовирусом, кодирующим консервативные антигены вируса гриппа А

Е. С. Седова, Л. В. Верховская, Э. А. Артемова, Д. Н. Щербинин, А. А. Лысенко, И. А. Руднева, А. В. Ляшко, С. А. Алексеева, И. Б. Есмагамбетов, Т. А. Тимофеева, М. М. Шмаров . . . 60

Особенности методического подхода к определению специфической активности интерферона альфа типа

М. Л. Байкова, И. М. Щербаченко, Л. А. Гайдерова, О. Б. Устинникова, А. А. Мовсесянц . . . 68

Хроника

Жанна Ильдаровна Авдеева (к 80-летию со дня рождения) . . . 74

Вячеслав Борисович Иванов (к 60-летию со дня рождения) . . . 75

Журнал «Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций

Свидетельство ПИ № ФС77-53128 от 14 марта 2013 г.

Учредитель: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Адрес учредителя и редакции: 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2

Подписной индекс в каталоге «Пресса России» — Т57941, в каталоге «Издания органов НТИ» агентства «Роспечать», агентства «Урал-Пресс» — 57941. Тираж 100 экз. Цена свободная

Издатель ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

Типография ООО «Буки Веди»: 115093, Москва, Партийный пер., д. 1, корп. 58, стр. 2

Подписано в печать: 20.03.2020

<https://www.biopreparations.ru>, e-mail: biopreparaty@expmed.ru

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

CONTENTS

Reviews

An Outbreak of a New Infectious Disease COVID-19: β -coronaviruses as a Threat to Global Healthcare

D. V. Gorenkov, L. M. Khantimirova, V. A. Shevtsov, A. V. Rukavishnikov, V. A. Merkulov, Yu. V. Olefir 6

Immune Response Induced by Immunisation with Antiviral Vaccines

N. A. Alpatova, Zh. I. Avdeeva, L. A. Gayderova, S. L. Lysikova, N. V. Medunitsyn 21

General Considerations on Clinical Trials of Hemophilia Medicines

Zh. I. Avdeeva, A. A. Soldatov, V. P. Bondarev, V. A. Merkulov 30

Original Articles

Internalization of Recombinant Imiglucerase into Mouse Peritoneal Macrophages and L929 Mouse Fibroblasts

I. V. Lyagoskin, M. S. Pantyushenko, O. M. Strizhakova, N. K. Kudina, E. Yu. Prudnikova, P. V. Chichkanova, S. G. Abbasova 42

Properties of Heterologous anti-Ebola Immunoglobulin after Long Storage

S. A. Melnikov, I. V. Borisevich, E. V. Rozhdestvensky, V. B. Pantyukhov, N. K. Chernikova, E. V. Gordeev, S. A. Nimirskaya, A. L. Khmelev, S. I. Syromyatnikova, I. V. Shatokhina, T. M. Plekhanova, G. D. Timankova, S. V. Borisevich, D. A. Kutaev, L. F. Stovba, E. Yu. Mishalova 50

Protecting Mice from H7 Avian Influenza Virus by Immunisation

with a Recombinant Adenovirus Encoding Influenza A Virus Conserved Antigens

E. S. Sedova, L. V. Verkhovskaya, E. A. Artemova, D. N. Shcherbinin, A. A. Lysenko, I. A. Rudneva, A. V. Lyashko, S. A. Alekseeva, I. B. Esmagambetov, T. A. Timofeeva, M. M. Shmarov 60

Aspects of a Methodological Approach to Determination of Interferon Alpha Specific Activity

M. L. Baykova, I. M. Shcherbachenko, L. A. Gayderova, O. B. Ustinnikova, A. A. Movsesyants 68

Chronicle

Zhanna Ildarovna Avdeeva (on the 80th Anniversary) 74

Vyacheslav Borisovich Ivanov (on the 60th Anniversary) 75

Journal "BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment" is registered
in the Federal Service for Supervision of Communications,
Information Technologies and Mass Communications

Certificate PI No. FS77-53128 dated March 14, 2013

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

Postal address of the founder and editorial office: 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051

Subscription indices are provided in the catalogue "Pressa Rossii"—T57941,
in the Rospechat agency' catalogue "Izdaniya organov NTI"—57941. Print run: 100 copies. Free price

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

Printing office "Buki Vedi": 1/58 Partiyiny lane, Moscow 115093

Passed for printing: March 20, 2020

<https://www.biopreparations.ru>, e-mail: biopreparaty@expmed.ru

Вспышка нового инфекционного заболевания COVID-19: β-коронавирусы как угроза глобальному здравоохранению

Д. В. Горенков^{1,*}, Л. М. Хантимирова¹, В. А. Шевцов¹, А. В. Рукавишников¹, В. А. Меркулов^{1,2}, Ю. В. Олефир¹

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

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

Коронавирусы являются самой большой группой из известных РНК-положительных вирусов. Коронавирусная инфекция способна поражать различные виды животных, а также человека. За последние два десятилетия коронавирусы явились причиной эпидемических вспышек двух респираторных заболеваний: ближневосточного респираторного синдрома и тяжелого острого респираторного синдрома. В конце 2019 г. в Китае был выявлен новый вид вируса, способный передаваться от человека к человеку, вызвавший вспышку вирусной пневмонии. Появление нового коронавируса подтверждает, что заболевания, вызываемые данной группой вирусов, являются угрозой для мирового здравоохранения в связи с возможностью возникновения пандемии и нуждаются в тщательном мониторинге. Цель работы — обзор текущей эпидемической ситуации по новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, с учетом предыдущих вспышек инфекций, вызванных β-коронавирусами MERS-CoV и SARS-CoV, как представляющих наибольшую опасность для человека. В обзоре кратко описаны две эпидемические вспышки, вызванные вирусами SARS-CoV (2002–2004 гг.) и MERS-CoV (2012 г. — настоящее время), представлена текущая эпидемическая ситуация, связанная с новым коронавирусом SARS-CoV-2, изложены основные ограничительные мероприятия, предпринимаемые для недопущения распространения инфекции в России. Рассмотрены аспекты возможной специфической терапии и разработки профилактических вакцинных препаратов против новой коронавирусной инфекции. Сделан вывод о возможном пандемическом потенциале вируса SARS-CoV-2 и высокой вероятности возникновения в будущем вспышек инфекций, вызванных новыми штаммами β-коронавирусов. Указано на необходимость осуществления тщательного мониторинга заболевания и проведения превентивных противоэпидемических мероприятий для сдерживания распространения инфекции.

Ключевые слова: коронавирус; заболеваемость; эпидемическая ситуация; MERS-CoV; SARS-CoV; SARS-CoV-2; COVID-19

Для цитирования: Горенков ДВ, Хантимирова ЛМ, Шевцов ВА, Рукавишников АВ, Меркулов ВА, Олефир ЮВ. Вспышка нового инфекционного заболевания COVID-19: β-коронавирусы как угроза глобальному здравоохранению. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(1):6–20. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-6-20>

Контактное лицо: Горенков Дмитрий Витальевич; gorenkov@expmed.ru

An Outbreak of a New Infectious Disease COVID-19: β-coronaviruses as a Threat to Global Healthcare

D. V. Gorenkov^{1,*}, L. M. Khantimirova¹, V. A. Shevtsov¹, A. V. Rukavishnikov¹, V. A. Merkulov^{1,2}, Yu. V. Olefir¹

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

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

Coronaviruses are the largest group of known positive-strand RNA viruses. Coronavirus infection can affect various animal species, as well as humans. Over the past two decades, coronaviruses have caused epidemic outbreaks of two respiratory diseases: the Middle East Respiratory Syndrome and Severe Acute Respiratory Syndrome. At the end of 2019, a new type of virus was detected in China. The virus has been spread by human-to-human transmission and has caused a viral pneumonia outbreak. The emergence of a new coronavirus proves that the diseases caused by this group of viruses pose a threat to global health due to the potential for a pandemic, and, therefore, need careful monitoring. The objective of the study was to analyse the current epidemic situation for the new coronavirus infection (COVID-19) caused by SARS-CoV-2, taking into account previous outbreaks of infections caused by MERS-CoV and SARS-CoV β-coronaviruses which pose the greatest threat to human

health. The review briefly describes two epidemic outbreaks caused by SARS-CoV (2002–2004) and MERS-CoV (2012–present), summarises the current epidemic situation for the new SARS-CoV-2 coronavirus, describes the main restrictive measures undertaken to prevent the spread of infection in Russia. The paper considers aspects of potential specific therapy and the development of prophylactic vaccines against the new coronavirus infection. The review concludes that SARS-CoV-2 has pandemic potential and that new strains of β-coronaviruses are likely to cause outbreaks in the future. The paper points to the need for careful monitoring of the disease and conducting preventive anti-epidemic measures to curb the spread of infection.

Key words: coronavirus; incidence; epidemiological situation; MERS-CoV; SARS-CoV; SARS-CoV-2; COVID-19

For citation: Gorenkov DV, Khantimirova LM, Shevtsov VA, Rukavishnikov AV, Merkulov VA, Olefir YuV. An outbreak of a new infectious disease COVID-19: β-coronaviruses as a threat to global healthcare. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(1):6–20. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-6-20>

Corresponding author: Dmitry V. Gorenkov; gorenkov@expmed.ru

В связи с продолжающейся вспышкой новой коронавирусной инфекции в Китае исследование роли коронавирусов в возникновении массовых инфекционных заболеваний и эпидемий становится особо актуальным.

Коронавирусы (*Coronaviridae*, CoVs) — это большое семейство РНК-содержащих вирусов (включает 2 подсемейства, 5 родов, 39 видов¹), которые у человека могут вызывать острые респираторные заболевания от легкой степени до таких тяжелых форм, как ближневосточный респираторный синдром (Middle East Respiratory Syndrome, MERS) и тяжелый острый респираторный синдром (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS).

Коронавирусы способны поражать респираторный, желудочно-кишечный тракт, печень и центральную нервную систему человека и многих других видов позвоночных животных, в том числе домашних животных и скота, птиц, летучих мышей и др. [1]. До эпидемических вспышек SARS в 2002 г. и MERS в 2012 г. коронавирусы не считались высокопатогенными для человека, так как ранее циркулировавшие в человеческой популяции вирусы у иммунокомпетентных лиц вызывали в основном только легкие формы заболевания. Тяжелые, зачастую летальные формы пневмонии, возникавшие при вспышках SARS и MERS у лиц без иммунодефицита, заставили по-новому оценить патогенность коронавирусов для человека.

Была доказана возможность передачи CoVs от человека к человеку [2, 3]. В конце 2019 г. возникла вспышка пневмонии неизвестной этиологии в г. Ухань провинции Хубэй Китайской Народной Республики (КНР). 7 января 2020 г. китайскими властями было подтверждено, что причиной вспышки является новый штамм коронавируса. 12 января 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) присвоила новому коронавирусу временное название — 2019-nCoV (2019 novel coronavirus, новый коронавирус 2019)², постоянное название — Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) было дано Международным комитетом по таксономии вирусов (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV) в феврале 2020 г. согласно действующим руководствам по номенклатуре вирусов. При этом ICTV признал новый вирус принадлежащим к тому же виду, что и вирус, ранее явившийся причиной эпидемии SARS³ [4]. Заболевание, вызываемое новым вирусом, ВОЗ было названо COVID-19 (Coronavirus disease 2019, коронавирусное заболевание 2019)⁴. Продолжающаяся эпидемия COVID-19

представляет серьезную угрозу человечеству⁵, включая прямое влияние на повседневную жизнь миллионов людей и негативное воздействие на мировую экономику [5].

Оценка риска развития пандемии в ходе текущей вспышки, в том числе риска распространения инфекции на территории Российской Федерации, вероятности возникновения в будущем новых эпидемий, вызванных β-коронавирусами, а также понимание возможных путей предотвращения и борьбы с новым заболеванием являются, несомненно, актуальными проблемами мирового здравоохранения.

Цель работы — обзор текущей эпидемической ситуации по новому инфекционному заболеванию COVID-19, вызываемому вирусом SARS-CoV-2, с учетом предыдущих вспышек инфекций, вызванных β-коронавирусами MERS-CoV и SARS-CoV, как представляющих наибольшую опасность для человека.

Коронавирусы: таксономия, геном, строение вириона

Коронавирусы представляют собой оболочечные вирусы, содержащие одноцепочечную РНК положительной полярности, относятся к порядку *Nidovirales*, семейству *Coronaviridae*, которое включает 2 подсемейства — *Orthocoronavirinae* и *Letovirinae*. Подсемейство *Orthocoronavirinae* включает 4 рода: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamma coronavirus*, *Delta coronavirus*⁶. Как правило, α- и β-коронавирусы инфицируют млекопитающих, а γ- и δ-коронавирусы — птиц [6].

К настоящему времени известно 6 видов коронавирусов, способных заражать людей: *Human coronavirus 229E*, *Human coronavirus NL63* (α-коронавирусы), *Betacoronavirus 1*, *Human coronavirus HKU1*, *Middle East respiratory syndrome-related coronavirus*, *Severe Acute Respiratory Syndrome-related coronavirus* (β-коронавирусы).

Коронавирусы обладают самым крупным среди РНК-вирусов геномом, от 26 до 32 тыс. нуклеотидов, что в 2 и более раз превосходит геном любых других РНК-вирусов [8].

Вирион представителей подсемейства *Orthocoronavirinae* имеет сферическую форму диаметром 120–160 нм (рис. 1).

Вирионы всех коронавирусов имеют липидную оболочку с булавовидными пепломерами длиной 5–10 нм, формируемыми тримерами белка S. Наличие этих пепломеров, напоминающих зубцы короны, дало название всему семейству *Coronaviridae* [9]. Помимо белка S вирусный геном кодирует основные структурные протейны: Е (малый оболочечный бе-

¹ International Committee of Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>

² Coronavirus disease (COVID-19) outbreak. WHO. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>

³ International Committee of Taxonomy of Viruses. Naming the 2019 Coronavirus. <https://talk.ictvonline.org>

⁴ Coronavirus disease (COVID-19) outbreak. WHO. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>

⁵ Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV). WHO; 2020. [https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov))

⁶ International Committee of Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org>

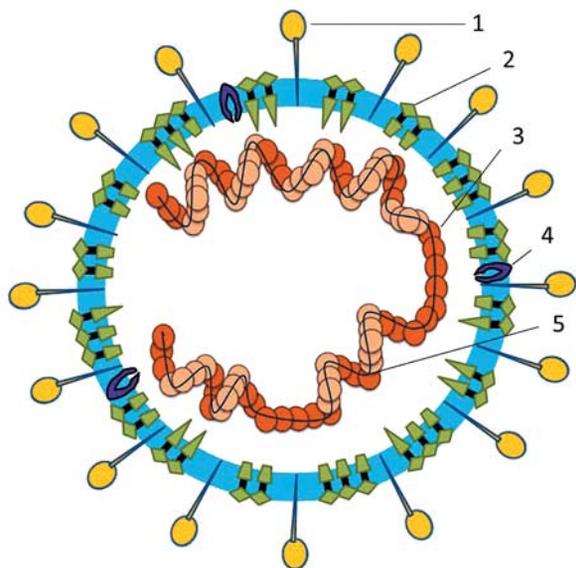


Рис. 1. Схема строения вирусной частицы коронавируса (по L. Geng [7] с изменениями). (1) поверхностный гликопротеин, S; (2) мембранный гликопротеин, M; (3) белок нуклеокапсида, N; (4) оболочечный гликопротеин, E; (5) РНК.

Fig. 1. The structure of the coronavirus particle (adapted from L. Geng [7]). (1) spike glycoprotein, S; (2) membrane glycoprotein, M; (3) nucleocapsid protein, N; (4) envelope glycoprotein, E; (5) RNA.

лок), М (мембранный гликопротеин) и N (нуклеокапсидный белок). Гены неструктурных белков репликативного комплекса занимают две трети генома и транслируются в большой полипротеин, состоящий из 16 белков. Эти гены консервативны для всех коронавирусов [10]. S-протеин ответствен за связывание с рецептором и последующее проникновение в клетку-хозяина, в связи с чем рассматривается в качестве основной мишени для терапии [11–14]. М-протеин имеет три трансмембранных домена, он придает вириону его форму, вызывая изгиб мембраны [15, 16]. Е-протеин необходим для вирусной сборки и выхода вируса из клетки, играя важную роль в патогенезе заболевания [17, 18]. Нуклеокапсид имеет спиральную симметрию и формируется фосфорилированным белком N, содержащим 2 домена, в комплексе с вирионной РНК [9, 19–21]. N-протеин также является антагонистом интерферона и супрессором РНК-интерференции, тем самым способствуя вирусной репликации [22].

Тяжелый острый респираторный синдром (SARS)

Тяжелый острый респираторный синдром представляет собой вирусное респираторное заболевание, вызываемое подвидом коронавируса Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) вида Severe Acute Respiratory Syndrome-related coronavirus [23–25]. Считается, что это вирус животного происхождения, преодолевший межвидовой барьер и ставший патогенным для человека. SARS-CoV относится к подгруппе 2b β-коронавирусов [26]. Пути передачи от животных к человеку или другим видам животных остаются невыясненными. Пер-

вые случаи заражения людей SARS-CoV произошли в провинции Гуандун (КНР), в ноябре 2002 г., но возбудитель был выявлен только через три месяца. Причиной глобальной вспышки послужило ускоренное распространение вируса в Гонконге⁷. Передача вируса от человека человеку происходила главным образом воздушно-капельным и контактным путями. Также были отмечены случаи заражения фекально-оральным путем через инфицированные предметы и поверхности [26]. В ходе эпидемии была распространена нозокомиальная передача SARS-CoV [26, 27]. В 2003 г. вирус распространился в 29 странах, было зарегистрировано 8098 случаев, смертность составила почти 10% (табл. 1), для пациентов в возрасте старше 60 лет — более 50%. Об окончании эпидемии было объявлено ВОЗ в июле 2003 г., последние случаи заболевания SARS были зарегистрированы в январе 2004 г.⁸ [26].

Входными воротами инфекции SARS является респираторный тракт. Связывание вируса с клетками опосредовано рецепторами ангиотензинпревращающего фермента-2 (ACE2), которые обширно представлены в эпителиальных клетках альвеол, трахеи, бронхов, а также тонкого кишечника [3, 26]. Продолжительность инкубационного периода заболевания колеблется от 2 до 10 сут⁹, в среднем — 4,6 сут [27, 28]. Затем развивается повышение температуры тела (38 °C и выше), сопровождаемое лихорадкой, сухим кашлем, болью в горле и грудной клетке, миалгией и, часто, диареей, рвотой и болями в животе¹⁰ [3]. Через несколько суток развивается пневмония, которая примерно в 25% случаев быстро прогрессирует, что может привести к фатальной дыхательной недостаточности [26].

Природные резервуары SARS-CoV окончательно не установлены, в качестве потенциальных природных хозяев рассматриваются летучие мыши [29]. Предположительным промежуточным хозяином являются гималайские циветы (*Paguma larvata*), употребляемые в качестве деликатесов на юге Китая [26, 29–31]. В целях изучения распространения коронавируса SARS-CoV среди животных были экспериментально заражены летучие мыши, хорьки и домашние кошки, была подтверждена эффективная передача вируса. Эти данные показывают, что резервуаром для вируса SARS-CoV могут являться многие виды животных [32].

Лекарственных средств для специфической терапии или вакцин для профилактики SARS зарегистрировано не было, для лечения пациентов применялась в основном поддерживающая терапия. Тем не менее в разработке находился широкий спектр вакцин (инактивированные, живые аттенуированные, векторные, субъединичные, ДНК-вакцины), целевым белком при создании которых был S-протеин. С целью потенциальной специфической терапии изучались различные средства: ингибиторы протеазы вируса или человека, моноклональные и поликлональные антитела (проводились доклинические исследования на животных или *in vitro*), плазма от выздоравливающих пациентов, интерфероны, в том числе в комбинации с иммуноглобулинами или тимозинами, рибавирин в комбинации с кортикостероидами или лопинавиром и ритонавиром (применялись у пациентов «вне инструкции»). Ввиду отсутствия строгих клинических исследований оценить пользу применения для пациентов данных видов терапии затруднительно [3].

⁷ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: outbreak of severe acute respiratory syndrome — worldwide, 2003. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2003; 52(13):269–72.

⁸ WHO guidelines for the global surveillance of severe acute respiratory syndrome (SARS). Updated recommendations, October 2004. https://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_ARO_2004_1/en/

⁹ Там же.

¹⁰ Severe acute respiratory syndrome (SARS). Wkly Epidemiol Rec. 2003;78(12):81–8.

Вспышка нового инфекционного заболевания COVID-19: β-коронавирусы как угроза глобальному здравоохранению An Outbreak of a New Infectious Disease COVID-19: β-coronaviruses as a Threat to Global Healthcare

Таблица 1. Эпидемиологические и биологические характеристики SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2 и вызываемых ими заболеваний¹¹ [2, 3]

Table 1. Epidemiological and biological characteristics of SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, and the diseases they cause¹¹ [2, 3]

Показатель Characteristic	Название вируса Virus		
	SARS-CoV (SARS)	MERS-CoV (MERS)	SARS-CoV-2 (COVID-19)
Род Genus	<i>Betacoronavirus</i> , линия B lineage B	<i>Betacoronavirus</i> , линия C lineage C	<i>Betacoronavirus</i> , линия B lineage B
Предполагаемый природный резервуар Suspected natural reservoir	Летучие мыши Bats		
Предполагаемый промежуточный хозяин Suspected intermediate host	Гималайские циветы Himalayan palm civets	Одногорбые верблюды Arabian camel	Нет данных No data available
Место первого выявления вируса Place where the virus was first detected	КНР, провинция Гуандун People's Republic of China, Guangdong province	Аравийский полуостров Arabian Peninsula	КНР, провинция Хубэй People's Republic of China, Hubei province
Количество зарегистрированных случаев заболевания Number of reported cases	8098	2502 (с апреля 2012 г. по декабрь 2019 г.) (from April 2012 to December 2019)	82 149 (с декабря 2019 г. по 27 февраля 2020 г.) (from December 2019 to 27 February 2020)
Количество стран и территорий с выявленными случаями заболевания Number of countries and territories where cases were reported	29	27	48
Количество смертей Number of deaths	774	861	2801
Уровень летальности среди заболевших, % Mortality rate among patients, %	~10	~35	~2–5
Базовый показатель репродукции R_0 Basic reproductive ratio R_0	2–5	<1	1,4–6,5
Нозоареал Nosoreal	Глобальный Global	Региональный Regional	Глобальный Global
Передача инфекции Transmission of infection	От животного к человеку; от человека к человеку Animal-to-human; human-to-human		
Основной путь передачи от человека к человеку Main route of transmission from human to human	Воздушно-капельный, контактный Droplet, contact	Контактный Contact	Воздушно-капельный, контактный Droplet, contact
Инкубационный период у человека, сут Incubation period in humans, days	2–10	2–16	1–12,5
Преобладающий транс-мембранный рецептор Major transmembrane receptor	ACE2	DPP4	ACE2
Распределение рецепторов в организме Distribution of receptors in the body	Эндотелий сосудов; гладкие мышцы артерий; тонкий кишечник; эпителий респираторного тракта; альвеолярные моноциты и макрофаги Vascular endothelium; arterial smooth muscle; small intestine; respiratory tract epithelium; alveolar monocytes and macrophages	Эпителий респираторного тракта; почки; тонкий кишечник; печень; простата; активированные лейкоциты Respiratory tract epithelium; kidney; small intestine; liver; prostate; activated leukocytes	Эндотелий сосудов; гладкие мышцы артерий; тонкий кишечник; эпителий респираторного тракта; альвеолярные моноциты и макрофаги Vascular endothelium; arterial smooth muscle; small intestine; respiratory tract epithelium; alveolar monocytes and macrophages

¹¹ Coronavirus. WHO. <https://www.who.int/health-topics/coronavirus>

Восприимчивость клеточных линий человека <i>in vitro</i> <i>In vitro susceptibility of human cell lines</i>	Клетки респираторного тракта, почек, печени <i>Respiratory tract, kidney, and liver cells</i>	Клетки респираторного тракта, кишечного тракта, урогенитального тракта, печени, почек, нейронов, моноцитов, Е-лимфоцитов, гистиоцитарные клеточные линии <i>Cells of the respiratory tract, intestine, urogenital tract, liver, kidney, neurons, monocytes, E-lymphocytes, histiocytic cell lines</i>	Нет данных <i>No data available</i>
Способность угнетать выработку интерферона <i>Ability to inhibit interferon production</i>	Да (отложенное распознавание вируса и провоспалительный эффект) <i>Yes</i> (delayed virus recognition and pro-inflammatory effect)	Да (отложенное распознавание вируса и провоспалительный эффект) <i>Yes</i> (delayed virus recognition and pro-inflammatory effect)	Нет данных (возможно, да, учитывая строение вируса и клиническую картину заболевания) <i>No data available</i> (but there is a probability, given the virus structure and the clinical picture)

Ближневосточный респираторный синдром (MERS)

Ближневосточный респираторный синдром — вирусное респираторное заболевание, вызываемое коронавирусом вида *Middle East respiratory syndrome-related coronavirus* (MERS-CoV), который был впервые выявлен в Саудовской Аравии в июне 2012 г. MERS-CoV относится к подгруппе 2с β-коронавирусов (табл. 1). MERS-CoV, так же как и SARS-CoV, является коронавирусом животных, способным заражать людей [2]. Путь передачи от животных к человеку не до конца выяснен, но однокорбы верблюды, вероятно, являются промежуточным хозяином для MERS-CoV и источником инфекции для людей. Инфицирование людей происходит при прямом или косвенном контакте с зараженными верблюдами. Происхождение вируса до конца не изучено, но, согласно анализу различных вирусных геномов, считается, что вирус изначально возник у летучих мышей [33–36], после чего произошла передача инфекции верблюдам [37]. Вирус не может легко передаваться от человека к человеку, если нет тесного контакта, например при незащищенном уходе за инфицированным пациентом. Передача от человека к человеку ограничена, и до настоящего времени были выявлены только случаи заражения среди членов семьи, пациентов и работников здравоохранения. До настоящего времени в мире не было зафиксировано ни одной устойчивой передачи вируса от человека к человеку¹².

Начиная с сентября 2012 г. по конец декабря 2019 г. ВОЗ сообщила о 2502 лабораторно подтвержденных случаях инфицирования людей MERS-CoV в 27 странах, смертность от инфекции составила почти 35% (861 летальный исход). Приблизительно 80% случаев заболеваемости людей были зарегистрированы в Саудовской Аравии. Следует отметить, что случаи, выявленные за пределами Ближнего Востока, были связаны с перемещением людей, инфицированных на Ближнем Востоке¹³.

Первичным рецептором при инфицировании MERS-CoV является многофункциональный поверхностный клеточный протеин дипептидилпептидаза-4 (DPP4), экспрессируемый

в большом количестве на эпителиальных клетках почек, альвеол, тонкого кишечника, печени и простаты [38, 39]. В среднем инкубационный период продолжается 5–6 сут, варьируя от 2 до 16 сут [40]. Клинические проявления и степень их выраженности могут сильно отличаться: от отсутствия симптомов (бессимптомное течение) или легких респираторных проявлений до тяжелых острых легочных заболеваний и летального исхода. Типичным проявлением болезни являются жар, кашель и одышка. Пневмония является распространенным осложнением, но не всегда присутствует. Отмечаются также симптомы расстройства желудочно-кишечного тракта, в том числе диарея. Тяжелая болезнь может вызвать дыхательную недостаточность, которая требует искусственной вентиляции легких и нахождения пациента в отделении интенсивной терапии. Вирус вызывает более тяжелые заболевания у пожилых людей, людей с ослабленной иммунной системой и людей с хроническими заболеваниями, такими как почечная недостаточность, рак, хронические заболевания легких и диабет¹⁴ [41, 42].

В настоящее время в разработке находятся несколько профилактических вакцин и препаратов для специфического лечения MERS, однако ни один из них не зарегистрирован для применения у человека по данному показанию. Как и в ходе вспышки SARS, в качестве лечения MERS в основном применяется поддерживающая терапия исходя из клинического состояния пациента¹⁵. Разрабатываемые вакцины включают субъединичные, рекомбинантные векторные и ДНК-вакцины [3]. Все проводимые в настоящее время клинические исследования вакцин являются исследованиями I или I/II фазы, в том числе исследования двух отечественных векторных вакцин¹⁶. В качестве возможной специфической терапии исследуются те же группы препаратов, что и при эпидемической вспышке SARS; «вне инструкции» у пациентов применялись интерфероны (часто в комбинации с антибиотиками широкого спектра и экстракорпоральной мембранной оксигенацией (ЭКМО)), рибавирин (часто также в комбинации с антибиотиками широкого спектра и ЭКМО) и лопинавир с ритонавиром [3].

¹² MERS situation update, December 2019. WHO. <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mer-cov/mer-cov-situation-update-december-2019.html>

¹³ Там же.

¹⁴ MERS situation update, November 2019. WHO. <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mer-cov/mer-cov-situation-update-november-2019.html>

¹⁵ Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). Key facts. WHO; 2019. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mer-cov\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mer-cov))

¹⁶ Study of Safety and Immunogenicity of BVRS-GamVac. <https://clinicaltrials.gov>

Study of Safety and Immunogenicity of BVRS-GamVac-Combi. <https://clinicaltrials.gov>

Заболевание COVID-19, вызываемое вирусом SARS-CoV-2

31 декабря 2019 г. органы здравоохранения Китая проинформировали ВОЗ о случаях пневмонии неизвестной этиологии, обнаруженной в г. Ухань (провинция Хубэй, КНР). 7 января 2020 г. экспертами Китая было установлено, что причиной является коронавирус 2019-nCoV (SARS-CoV-2). Коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой новый штамм, который ранее не был идентифицирован у людей. 30 января 2020 г. комитет ВОЗ по чрезвычайным ситуациям объявил, что текущая вспышка коронавирусной инфекции соответствует критериям чрезвычайной ситуации для здравоохранения международного значения¹⁷.

По состоянию на 27 февраля 2020 г. было зарегистрировано 82149 лабораторно подтвержденных случаев заражения новым коронавирусом SARS-CoV-2 (из них в КНР — 78630), в том числе 2801 с летальным исходом. Количество ежедневно регистрируемых в Китае новых случаев заболевания показано на рисунке 2 (с 12.02.2020 по 18.02.2020 изменялась методика регистрации случаев в провинции Хубэй — в подсчет включались случаи с клиническим подтверждением, что объясняет пик на графике для 12.02.2020). Большинство случаев заболевания протекает в легкой форме, около 15% — в тяжелой. В КНР отслежены 652174 лица, контактировавших с заболевшими, 71572 находятся под наблюдением¹⁸. Летальность в мире на конец февраля 2020 г. составляет почти 3,5%. Эпидемическая кривая регистрируемых ежедневно новых случаев заболевания COVID-19 (рис. 2) свидетельствует о том, что пик эпидемии, связанный в основном с распространением вируса внутри Китая, пройден, и на первый план начинают выступать угрозы, сопряженные с локальными и региональными вспышками COVID-19 в мире. Помимо КНР подтвержденные случаи зарегистрированы в 44 странах (рис. 3, табл. 2). За пределами КНР на 27.02.2020 зарегистрировано 54 случая смерти. Количество новых ежедневно регистрируемых случаев заболевания в мире (за исключением КНР) уже превышает количество регистрируемых внутри КНР новых случаев COVID-19 (табл. 2). По общему количеству зарегистрированных случаев заболевания и количеству летальных случаев эпидемия вируса SARS-CoV-2 существенно превосходит предыдущие вспышки коронавирусных инфекций, вызванных SARS-CoV и MERS-CoV, что может свидетельствовать о серьезном пандемическом потенциале текущей инфекции (табл. 1).

Как и в случае SARS-CoV и MERS-CoV, основным резервуаром инфекции SARS-CoV-2 могут являться летучие мыши, при этом промежуточный хозяин не установлен (табл. 1) [43]. По первоначальным сообщениям многие из пациентов в г. Ухань (КНР) имели связь с крупным рынком

морепродуктов и животных, что позволило предположить передачу вируса от животных к человеку¹⁹. Однако затем стало увеличиваться количество пациентов, не имевших прямого контакта с животными, продававшимися на данном рынке, что указывало на распространение вируса путем передачи от человека к человеку. Позднее данные подтвердили передачу вируса от человека к человеку, в том числе за пределами Китая²⁰.

Предполагается, что основными путями передачи вируса являются воздушно-капельный и контактный. От человека к человеку вирус передается при тесном контакте. Согласно определению ВОЗ, данному в промежуточном руководстве по надзору за выявлением случаев инфицирования людей новым коронавирусом (nCoV)²¹, к тесным контактам относятся:

- оказание медицинской помощи больным, включая обеспечение прямого ухода за инфицированными вирусом nCoV пациентами, работу с медицинскими работниками, инфицированными nCoV, посещение пациентов, инфицированных nCoV, или близкое нахождение с ними в одном пространстве;
- совместная работа в непосредственной близости от человека, инфицированного nCoV, или использование одного и того же учебного кабинета;
- поездка с человеком, инфицированным nCoV, на любом виде транспорта;
- проживание в одной семье с человеком, инфицированным nCoV.

При этом в каждом рассматриваемом случае необходимо учитывать любую эпидемическую связь, которая могла иметь место в течение 14 сут до или после начала заболевания²².

Предполагается, что первичным рецептором при инфицировании SARS-CoV-2 является, как и в случае инфекции SARS-CoV, белок человека ACE2 [44, 45]. Срок инкубационного периода, по предварительным оценочным данным, составляет от 1 до 12,5 сут, в среднем 5–6 сут²³. Основными симптомами заболевания являются повышенная температура, утомление, кашель с небольшим количеством мокроты. При дальнейшем развитии болезни у примерно 15% заболевших появляется диспноэ. Повышенная температура тела регистрируется более чем у 90% больных, сухой кашель — примерно у 80%, чувство сдавленности в грудной клетке — более чем у 20%. У более чем 80% заболевших по результатам клинических лабораторных анализов выявляется пониженное содержание лимфоцитов в крови, нормальное или пониженное содержание лейкоцитов. Может повышаться активность «печеночных» ферментов; на рентгенограмме легких возможно обнаружение экссудатов с симптомом «матового стекла». Болезнь проявляется как острый тяжелый респираторный синдром, часто протекающий в виде пневмоний²⁴.

¹⁷ Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV). WHO; 2020. [https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov))

¹⁸ О случаях заболевания COVID-19 по состоянию на 08.00 (мск) от 27.02.2020 г. Роспотребнадзор. https://rospotrebnadzor.ru/region/korono_virus/epid.php

¹⁹ Novel coronavirus — China. WHO; 2020. <http://www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/>

²⁰ Эпидемиологическая обстановка и распространение COVID-19 в мире по состоянию на 08.00 (мск) от 28.02.2020 г. Роспотребнадзор. https://rospotrebnadzor.ru/region/korono_virus/epid.php

²¹ Surveillance case definitions for human infection with novel coronavirus (nCoV). Interim guidance v1. January 2020. WHO. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330376/WHO-2019-nCoV-Surveillance-v2020.1-eng.pdf>

²² Там же.

²³ Novel Coronavirus (2019-nCoV). Situation Report-7. WHO. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200127-sitrep-7-2019-ncov.pdf?sfvrsn=98ef79f5_2

²⁴ Временные рекомендации по лабораторной диагностике новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV от 21.01.2020. Роспотребнадзор. https://rospotrebnadzor.ru/region/korono_virus/files/spec/vrem%20rekom.pdf

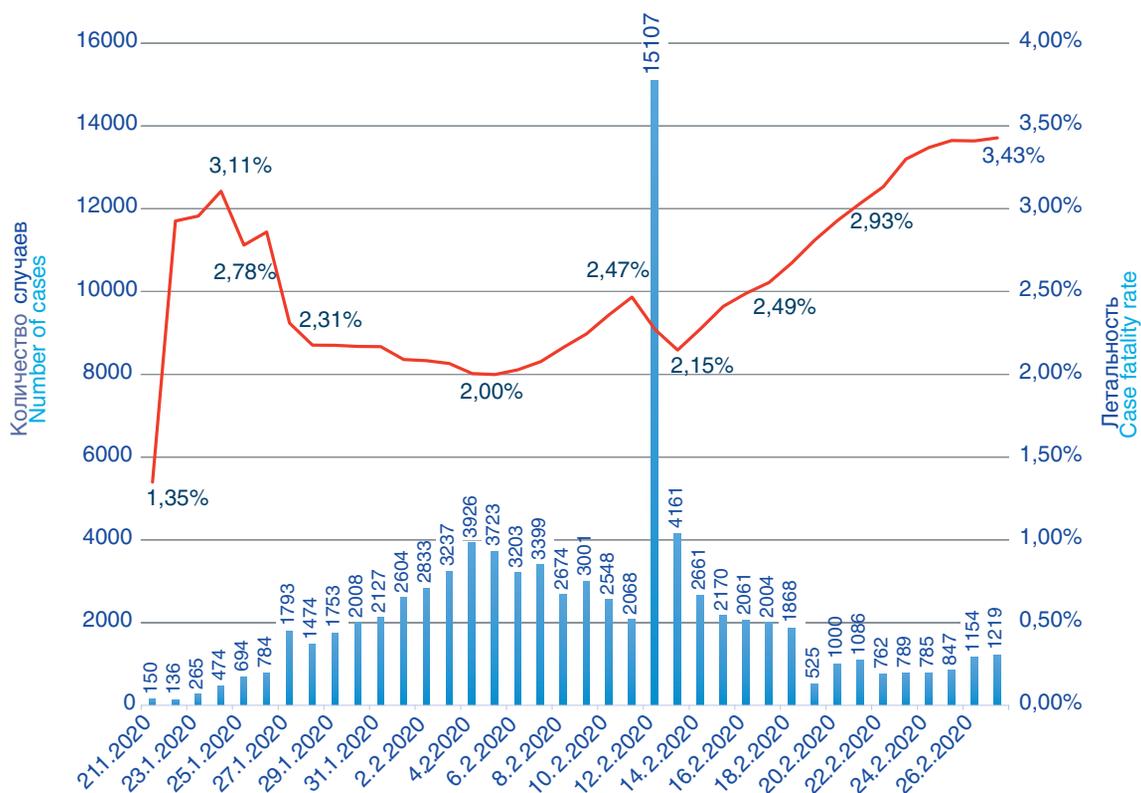


Рис. 2. Летальность и количество ежедневно регистрируемых новых случаев заболевания COVID-19 в мире²⁵.
 Fig. 2. Case fatality rate and number of new COVID-19 cases reported daily in the world²⁵.

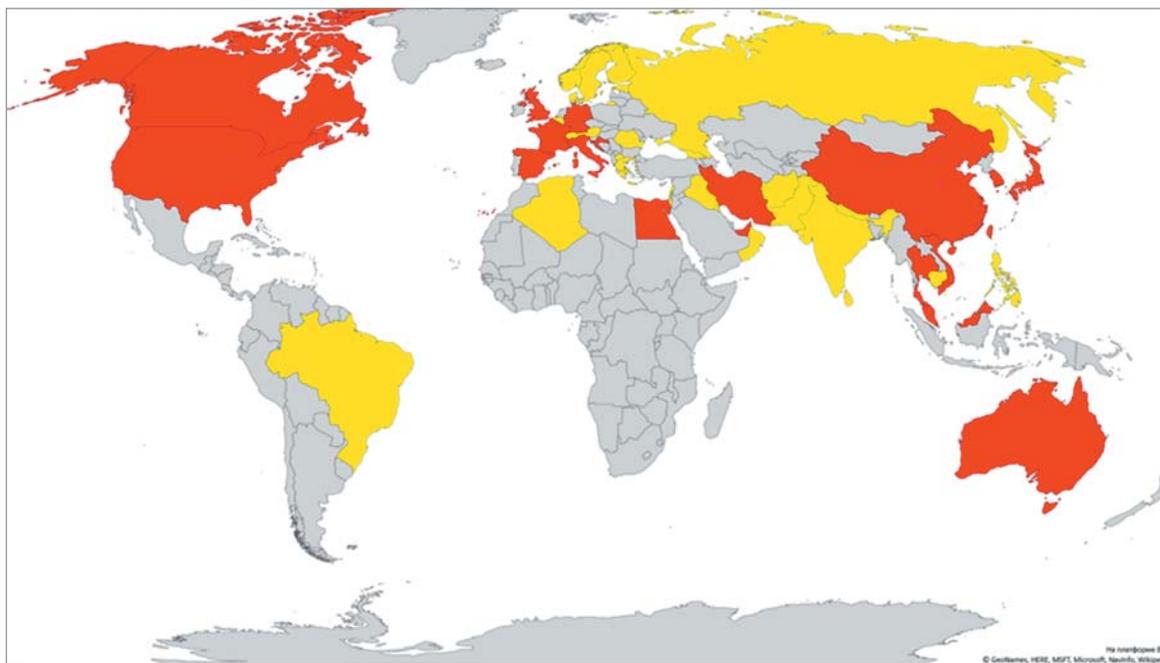


Рис. 3. Страны с подтвержденными случаями COVID-19 (на 27.02.2020 по данным ВОЗ)²⁶. Желтым цветом обозначены страны с подтвержденными случаями заболевания; красным — страны с подтвержденными случаями заболевания, в которых зафиксирована передача вируса от человека к человеку.
 Fig. 3. Countries with confirmed cases of COVID-19 (as of February 27, 2020, WHO data)²⁶. The countries with confirmed cases are shown in yellow; the countries with confirmed cases and human to human transmission of COVID-19 are shown in red.

²⁵ Эпидемиологическая обстановка и распространение COVID-19 в мире по состоянию на 08.00 (мск) от 28.02.2020 г. Роспотребнадзор. https://rospotrebnadzor.ru/region/korono_virus/epid.php

²⁶ Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation Report-38. WHO. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200227-sitrep-38-covid-19.pdf?sfvrsn=9f98940c_2

Вспышка нового инфекционного заболевания COVID-19: β-коронавирусы как угроза глобальному здравоохранению An Outbreak of a New Infectious Disease COVID-19: β-coronaviruses as a Threat to Global Healthcare

Таблица 2. Количество лабораторно подтвержденных случаев заболевания COVID-19 на 27.02.2020²⁷
Table 2. Number of laboratory-confirmed COVID-19 cases as of February 27, 2020²⁷

Регион Region	№ п/п No.	Дата ре- гистрации первого за- болевания Date when the first case was registered	Страна Country	Количество под- твержденных случаев заболевания (+за про- шедшие сутки) Number of confirmed cases (+data for the previous day)	Количество слу- чаев с летальным исходом (+за про- шедшие сутки) Number of fatal cases (+data for the previous day)
Западно- Тихоокеанский регион Western Pacific Region	1	01.12.19	КНР (включая Тайвань, Гонконг и Макао) People's Republic of China (including Taiwan, Hong Kong, and Macau)	78 630 (440)	2747 (29)
	2	14.01.20	Япония Japan	172 (11)	3 (2)
			Круизный лайнер «Diamond Princess» Diamond Princess cruise ship	705 (14)	4
	3	19.01.20	Республика Корея Republic of Korea	1595 (449)	13 (1)
	4	23.01.20	Вьетнам Vietnam	16	0
	5	24.01.20	Сингапур Singapore	93 (2)	0
	6	25.01.20	Австралия Australia	23 (1)	0
	7	25.01.20	Малайзия Malaysia	22	0
	8	27.01.20	Камбоджа Cambodia	1	0
9	30.01.20	Филиппины Philippines	3	1	
Юго-Восточная Азия South-East Asia	10	12.01.20	Таиланд Thailand	40 (3)	0
	11	24.01.20	Непал Nepal	1	0
	12	27.01.20	Шри-Ланка Sri Lanka	1	0
	13	30.01.20	Индия India	3	0
Европейский регион European Region	14	25.01.20	Франция France	18 (4)	2 (1)
	15	28.01.20	Германия Germany	27 (9)	0
	16	29.01.20	Финляндия Finland	2 (1)	0
	17	30.01.20	Италия Italy	453 (131)	12 (1)
	18	31.01.20	Великобритания United Kingdom	13	0
	19	31.01.20	Испания Spain	13 (4)	0
	20	31.01.20	Россия Russia	2	0
	21	31.01.20	Швеция Sweden	2 (1)	0
	22	04.02.20	Бельгия Belgium	1	0
	23	21.02.20	Израиль Israel	2	0
	24	25.02.20	Австрия Austria	2	0
	25	25.02.20	Хорватия Croatia	3 (2)	0

²⁷ 0 случаях заболевания COVID-19 по состоянию на 08.00 (мск) от 27.02.2020 г. https://rospotrebnadzor.ru/region/korono_virus/epid.php

Европейский регион European Region	26	25.02.20	Швейцария Switzerland	1	0
	27	26.02.20	Северная Македония North Macedonia	1 (1)	0
	28	26.02.20	Грузия Georgia	1 (1)	0
	29	26.02.20	Норвегия Norway	1 (1)	0
	30	26.02.20	Греция Greece	1 (1)	0
	31	26.02.20	Румыния Romania	1 (1)	0
Американский регион American Region	32	21.01.20	США USA	60 (3)	0
	33	26.01.20	Канада Canada	12 (1)	0
	34	26.02.20	Бразилия Brazil	1 (1)	0
Восточно-Средиземноморский регион Western Mediterranean Region	35	30.01.20	ОАЭ UAE	13	0
	36	14.02.20	Египет Egypt	1	0
	37	19.02.20	Иран Iran	139 (44)	19 (4)
	38	21.02.20	Ливан Lebanon	2 (1)	0
	39	23.02.20	Кувейт Kuwait	26 (15)	0
	40	24.02.20	Бахрейн Bahrain	33 (10)	0
	41	24.02.20	Оман Oman	4	0
	42	24.02.20	Афганистан Afghanistan	1	0
	43	24.02.20	Ирак Iraq	5	0
	44	26.02.20	Пакистан Pakistan	2 (2)	0
Африканский регион African Region	45	25.02.20	Алжир Algeria	1	0
Всего Total				82 149 (1154)	2801 (38)

Серьезную угрозу, как и при предыдущих вспышках коронавирусных инфекций, представляет нозокомиальная передача возбудителя. Так, например, согласно исследованию D. Wang с соавт. [46], госпитальное заражение SARS-CoV-2 было выявлено у 41% пациентов. В связи с этим следует строго соблюдать все необходимые меры по предотвращению вторичного инфицирования среди персонала и пациентов лечебных учреждений, где содержатся больные с подозрением на COVID-19.

Данные о генетической последовательности 2019-nCoV (SARS-CoV-2) были опубликованы в базе данных GenBank и на портале Глобальной инициативы по обмену всеми данными о гриппе (GISAID) 12 января 2020 г., что позволило начать разработку диагностических ПЦР-тестов для выявления новой инфекции²⁸. Новый коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой β-коронавирус линии 2b

и имеет по меньшей мере 70% сходства с генетической последовательностью SARS-CoV [27]. Генетический анализ 12 образцов вируса, полученных из нескольких регионов в Китае и Таиланде с 24 декабря 2019 по 13 января 2020 г., показал, что генетическое разнообразие представленных штаммов очень ограничено, и по предварительной оценке первое заражение человека произошло в ноябре 2019 г. [47]. Нуклеотидные последовательности генов SARS-CoV-2, полученные позже от пациентов в США, также показали их близкое сходство с геномами штаммов, выделенных в КНР²⁹. В нескольких странах (в том числе в Российской Федерации специалистами ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») были разработаны тест-системы для ПЦР-диагностики новой коронавирусной инфекции. Диагностические тест-системы имеются в наличии в региональных организациях Роспотребнадзора

²⁸ Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1, complete genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN908947.1>
GISAID. <https://www.gisaid.org/epiflu-applications/next-hcov-19-app/>

²⁹ Centers for Disease Control and prevention. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Situation Summary. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/summary.html>

для выявления нового коронавируса, определен алгоритм лабораторной диагностики³⁰. Однако существующие опасения в высоком числе ложноотрицательных результатов³¹ привели в том числе к изменению методики подсчета случаев заболевания новым коронавирусом в провинции Хубэй (КНР) и временному включению с 12.02.2020 по 18.02.2020 в число зарегистрированных случаев пациентов с диагнозом, подтвержденным только клинически³².

По состоянию на конец февраля 2020 г., в мире отсутствует какое-либо одобренное для применения специфическое лекарственное средство для профилактики или лечения COVID-19³³. Можно предположить, что, подобно SARS и MERS, основной потенциальной мишенью специфической терапии и профилактики нового коронавируса будет поверхностный гликопротеин S. Согласно официальному сообщению Национальной комиссии здравоохранения КНР, несколько вакцин-кандидатов против SARS-CoV-2 уже проходят доклинические исследования; также на стадии клинических исследований находятся несколько противовирусных препаратов для лечения COVID-19, включая хлорохина фосфат, фавапиривир и ремдесивир³⁴. Запланировано проведение нескольких клинических исследований, посвященных применению различных лекарственных препаратов для терапии новой коронавирусной инфекции: дарунавир в комбинации с кобициклатом, комбинации ингибитора протеазы ASC09 с ритонавиром в сравнении с комбинацией лопинавира и ритонавира, умифеновира, гидроксихлорохина и др.³⁵ [48].

С начала осложнения эпидемической ситуации по новому коронавирусу в Российской Федерации был организован мониторинг за эпидемической обстановкой, приняты дополнительные меры по усилению санитарно-карантинного контроля, отработан порядок действий медицинских работников при подозрении на инфекцию COVID-19; определен алгоритм лабораторной диагностики в случае выявления лиц с подозрением на коронавирусную инфекцию³⁶. Всех граждан с симптомами острых респираторных инфекций, развившимися в течение 14 сут после прибытия из КНР, изолируют, госпитализируют и обследуют лабораторно на весь перечень возможных возбудителей ОРВИ, включая новую коронавирусную инфекцию. С 03.02.2020 на неопределенное время было приостановлено железнодорожное сообщение с КНР³⁷, с 20.02.2020 — временно запрещен въезд граждан КНР в Россию³⁸.

В результате проводимого мониторинга на территории России были выявлены 2 случая заболевания новой коронавирусной инфекцией среди прибывших в страну граждан КНР³⁹.

24 января 2020 г. было принято Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О мероприятиях по недопущению распространения новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV», в котором определен перечень мероприятий по недопущению распространения новой коронавирусной инфекции в Российской Федерации⁴⁰. Правительством утверждена Национальный план по предупреждению завоза и распространения новой коронавирусной инфекции на территории Российской Федерации⁴¹.

Согласно данным ВОЗ, риск распространения коронавирусной инфекции в мире оценивается как высокий⁴². Несмотря на текущую благоприятную эпидемическую обстановку в России, проведение противозидемических мероприятий продолжается, риск дальнейшего завоза и распространения вируса SARS-CoV-2 в России, с учетом эпидемической ситуации в мире и эпидемических характеристик нового вируса, следует оценивать как остающийся на высоком уровне.

Эпидемическая характеристика COVID-19 в сравнении с SARS и MERS

Основные эпидемические характеристики всех трех инфекций представлены в таблице 1.

Источник возникновения заболевания. Предполагаемым основным природным резервуаром инфекции для всех трех вирусов являются летучие мыши. Передача вируса человеку произошла, предположительно, через промежуточного хозяина: цивет (SARS-CoV), одnogорбых верблюдов (MERS-CoV) или окончательно не установленного конкретного вида животного, возможно, цивет, панголинов или напрямую от летучих мышей, что менее вероятно (SARS-CoV-2) [3, 43, 49].

Механизм передачи от животного к человеку. Механизм и пути передачи коронавирусов остаются неизвестными. Для SARS-CoV и MERS-CoV основными путями передачи могут являться прямой контакт с зараженным животным (промежуточный хозяин) или употребление в пищу молока, термически не обработанного мяса или контакты с мочой (MERS) инфицированных животных [42]. Для SARS-CoV-2 также предполагается прямой контакт, употребление в пищу плохо обработанного мяса или использование час-

³⁰ Информационный бюллетень о ситуации и принимаемых мерах по недопущению распространения заболеваний, вызванных новым коронавирусом, от 03.02.2020. Роспотребнадзор. https://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=13616

³¹ Информационный бюллетень о ситуации и принимаемых мерах по недопущению распространения заболеваний, вызванных новым коронавирусом, от 18.02.2020. Роспотребнадзор. https://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=13744

³² National Health Commission of the People's Republic of China. Interpretation of New Coronavirus Pneumonia Diagnosis and Treatment Plan (Trial Version 6). <http://www.nhc.gov.cn>

³³ Q&A on coronaviruses (COVID-19). WHO. <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/q-a-coronaviruses>

³⁴ National Health Commission of the People's Republic of China. Several drugs against novel coronavirus already in clinical trials: official. http://en.nhc.gov.cn/2020-02/16/c_76602.htm

³⁵ <https://clinicaltrials.gov>

³⁶ Информационный бюллетень о ситуации и принимаемых мерах по недопущению распространения заболеваний, вызванных новым коронавирусом, от 03.02.2020. Роспотребнадзор. https://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=13616

³⁷ О временных ограничениях железнодорожного сообщения с Китаем. https://press.rzd.ru/news/public/ru?STRUCTURE_ID=654&layer_id=4069&refererLayerId=3307&page3307_810=4&id=95196

³⁸ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 31 января 2020 г. № 153-р.

³⁹ Информационный бюллетень о ситуации и принимаемых мерах по недопущению распространения заболеваний, вызванных новым коронавирусом, от 26.02.2020. Роспотребнадзор. https://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=13815

⁴⁰ Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 24.01.2020 № 2 «О дополнительных мероприятиях по недопущению завоза и распространения новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV».

⁴¹ Информационный бюллетень о ситуации и принимаемых мерах по недопущению распространения заболеваний, вызванных новым коронавирусом, от 18.02.2020. Роспотребнадзор. https://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=13744

⁴² Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation Report — 28. WHO. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200217-sitrep-28-covid-19.pdf?sfvrsn=a19cf2ad_2

тей тела зараженных животных в качестве компонента в составе лечебного средства традиционной китайской медицины [49].

Механизм передачи от человека к человеку. Основным путем передачи от человека к человеку для MERS-CoV является контактный; для SARS-CoV и SARS-CoV-2 — воздушно-капельный и контактный. Нозокомиальная передача инфекции играла основную роль в распространении SARS и MERS и является значительной в ходе эпидемии COVID-19⁴³ [3, 43].

Эпидемический потенциал. Базовый показатель репродукции инфекции (R_0) для MERS составляет 0,29–0,80, что свидетельствует об отсутствии эпидемического потенциала [50, 51]. Для SARS оценка этого показателя находится в пределах от 2 до 5 [51]. В конце января 2020 г. значение R_0 для COVID-19 экспертами ВОЗ было оценено от 1,4 до 2,5⁴⁴. При этом последующие исследования по оценке данного показателя, проведенные к настоящему времени, в целом указывают на более высокое значение показателя R_0 (табл. 3), сравнимое с R_0 для SARS, и возможно, даже превосходящее его [51–53]. Эти данные подтверждают высокий эпидемический потенциал вируса SARS-CoV-2.

Клиническая эпидемиология. Текущая вспышка COVID-19 значительно превосходит предыдущие вспышки SARS и MERS по общему числу зарегистрированных случаев, при этом уровень летальности среди заболевших (3,4% по состоянию на 27.02.2020) значительно ниже, чем при предыдущих эпидемических вспышках (табл. 1). За период настоящей эпидемической вспышки уже погибло более 2 тыс. человек, что превышает общее количество умерших в ходе эпидемий SARS и CoV. Следует отметить имеющиеся случаи бессимптомного течения COVID-19 (около 1,2%⁴⁶); при этом бессимптомное течение встречалось также при SARS и MERS, но значительно реже [26, 54–56]. Для COVID-19 характерно в целом более легкое течение болезни, чем при SARS и MERS⁴⁷ [42].

Распределение по полу и возрасту. Согласно исследованию, проведенному The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team (NCPERET)⁴⁸, вирус SARS-CoV-2 практически одинаково поражает как мужчин, так и женщин (соотношение заболевших лиц мужского и женского пола составляет 1,06:1), при этом уровень летальности среди заболевших мужчин существенно выше (табл. 4). Распределение заболевших по полу для SARS (0,75:1 соответственно) и MERS отличается от COVID-19, что, возможно, связано как со значительно меньшим числом проанализированных случаев заболевания, так и, в случае с MERS, где наблюдается почти в 2 раза больше случаев заболевания у мужчин, чем у женщин, может объясняться региональными культурными особенностями (доминирующее положение мужчин в обществе) [42, 57]. Большинство случаев SARS регистрировалось в основном у молодых здоровых лиц, в то время как около половины случаев MERS было зафиксировано у лиц старше 50 лет [42]. Почти 78% случаев COVID-19 выявлены у лиц в возрасте от 30 до 69 лет включительно; летальность среди заболевших увеличивается с возрастом. Так, в группе детей в возрасте до 9 лет летальность отсутствовала, у лиц от 10 до 39 лет она составила 0,2%, при этом повышенная летальность по сравнению со средней в популяции отмечалась у лиц старше 60 лет, а максимальный показатель летальности (14,8%) был зафиксирован в группе лиц старше 80 лет⁴⁹.

Сопутствующие заболевания. Сопутствующие заболевания являются серьезным фактором риска более тяжелого течения коронавирусной пневмонии и летального исхода заболевания⁵⁰ [26, 42, 54, 57]. Для SARS хронические сердечные заболевания, диабет, хронический гепатит В, злокачественные новообразования и хронические легочные заболевания являлись основными неблагоприятными прогностическими факторами [26, 42, 54]. В случае MERS такими факторами

Таблица 3. Оценка показателя репродукции инфекции (R_0) для COVID-19
Table 3. R_0 estimations for COVID-19

Источник оценки Estimation made by	Дата оценки Estimation date	R_0
ВОЗ ⁴⁵ WHO	23.01.20	1,4–2,5
Majumder M. [52]	27.01.20	2,0–3,3
Althaus C. [52]	25.01.20	2,2 (90% CI 1,4–3,8)
Tang B. [52]	24.01.20	6,47 (95% CI 5,71–7,23)
Read J. M. [52]	27.01.20	3,11 (90% CI 2,39–4,13)
Leung G. [52]	25.01.20	2,13 (1,92–2,31)
Gardner L. [52]	26.01.20	2
Li Q. [52]	29.01.20	2,2 (95% CI 1,4–3,9)

Примечание. CI — доверительный интервал.
Note. CI—confidence interval.

⁴³ The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19). China CDC Weekly. 2020.

⁴⁴ Statement on the meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV). WHO. [https://www.who.int/news-room/detail/23-01-2020-statement-on-the-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/23-01-2020-statement-on-the-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov))

⁴⁵ Там же.

⁴⁶ The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19). China CDC Weekly. 2020.

⁴⁷ Там же.

⁴⁸ Там же.

⁴⁹ Там же.

⁵⁰ Там же.

Таблица 4. Распределение заболевших COVID-19 по возрастным группам и полу в материковой части КНР к 11.02.2020 (по NCPERET⁵¹ с изменениями)
Table 4. Distribution of COVID-19 patients in mainland China by age and sex as of February 11, 2020 (adapted from NCPERET⁵¹)

Группа Group	Подтвержденные случаи, N (%) Confirmed cases, N (%)	Количество умерших, N (%) Number of deaths, N (%)	Уровень летальности среди заболевших, % Case fatality rate, %
Все возрастные группы All age groups	44 672	1023 (100)	2,3
0–9 лет 0–9 years	416 (0,9)	-	-
10–19 лет 10–19 years	549 (1,2)	1 (0,1)	0,2
20–29 лет 20–29 years	3619 (8,1)	7 (0,7)	0,2
30–39 лет 30–39 years	7600 (17,0)	18 (1,8)	0,2
40–49 лет 40–49 years	8571 (19,2)	38 (3,7)	0,4
50–59 лет 50–59 years	10 008 (22,4)	130 (12,7)	1,3
60–69 лет 60–69 years	8583 (19,2)	309 (30,2)	3,6
70–79 лет 70–79 years	3918 (8,8)	312 (30,5)	8,0
80 лет и старше 80 years and older	1408 (3,2)	208 (20,3)	14,8
Мужчины Men	22 981 (51,4)	653 (63,8)	2,8
Женщины Women	21 691 (48,6)	370 (36,2)	1,7

Примечание. NCPERET — The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. «-» данные отсутствуют.
Note. NCPERET—the Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. - not available.

являются диабет, гипертензия, хроническая почечная недостаточность, злокачественные новообразования, хронические заболевания сердца, легких и печени [42, 54, 57]. Для COVID-19 к сопутствующим заболеваниям, ухудшающим течение болезни и ее исход, относятся сердечно-сосудистые заболевания, диабет, хронические респираторные заболевания, гипертензия и рак⁵².

Уязвимые группы населения. Повышенному риску заражения подвергаются лица с сопутствующими заболеваниями, курящие, работники здравоохранения (COVID-19, MERS, SARS), лица пожилого возраста (COVID-19, MERS), лица с ожирением (MERS) и др.⁵³ [26, 42, 54, 57].

Заключение

Наблюдаемая эпидемическая ситуация по заболеваемости COVID-19 демонстрирует, что вспышки новых вирусных инфекций человека продолжают оставаться актуальной проблемой мирового общественного здравоохранения. Эпидемический риск этих вспышек зависит от характеристик вируса, в том числе от того, насколько быстро он распространяется между людьми, тяжести возникающего заболевания и медицинских или других мер, доступных для контроля эпидемической ситуации. На конец февраля 2020 г. остается еще много вопросов о новом коронавирусе: его природном резервуаре, путях передачи, пандемическом потенциале. В этой связи можно предполагать, что текущая вспышка β-коронавирусной инфекции не является последней, так как пока не разработано доказавших свою эффективность вакцин и противовирусных

препаратов против коронавирусов, а имеющиеся знания об их эпидемиологии ограничены. Возможным новым эпидемическим вспышкам будет также способствовать рост численности населения, освоение человеком новых территорий, увеличение контактов между человеком и дикими животными, развитие транспортного сообщения между странами.

Исходя из быстрого распространения инфекции, большого количества инфицированных и высокого базового показателя репродукции инфекции, можно утверждать, что текущая эпидемия COVID-19 является более опасной в сравнении с предыдущими вспышками пневмоний, вызванных коронавирусами. Высокий уровень угрозы глобального распространения нового вируса признан ВОЗ. Ввиду отсутствия специфической терапии особое значение имеют меры профилактики и санитарно-карантинного надзора, ранней диагностики и репортирования о возможных случаях инфекции, активная поддерживающая терапия заболевших и своевременное информирование населения об эпидемической ситуации и профилактике коронавирусных заболеваний. При этом разработка и клинические исследования профилактических и терапевтических препаратов против коронавирусов дают надежду на получение эффективного средства для борьбы и контроля за коронавирусными инфекциями.

Вклад авторов. Д. В. Горенков — написание текста, оформление рукописи, работа с графическим материалом, редактирование и переработка рукописи; Л. М. Хантирова — сбор и систематизация данных, доработка текста; В. А. Шевцов — концепция и дизайн исследова-

⁵¹ Там же.

⁵² Там же.

⁵³ Там же.

ния; **А. В. Рукавишников** — окончательное утверждение версии рукописи для публикации; **В. А. Меркулов** — обобщение результатов исследования, формулировка выводов; **Ю. В. Олефир** — идея исследования, интерпретация результатов исследования.

Authors' contributions. *Dmitry V. Gorenkov*—writing the text, preparation of the graphic material, editing and rewriting the manuscript; *Leysan M. Khantimirova*—collection and systematisation of data, revising the text; *Vladimir A. Shevtsov*—study concept and design; *Andrey V. Rukavishnikov*—final approval of the version to be published; *Vadim A. Merkulov*—summarising the research results, formulating conclusions; *Yuri V. Olefir*—idea of the study, interpretation of the study results.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicity funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

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

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

Литература/References

1. Chen Y, Guo D. Molecular mechanisms of coronavirus RNA capping and methylation. *Virology*. 2016;31(3):3–11. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3726-4>
2. Cui J, Li F, Shi Z. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17:181–92. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
3. Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, et al. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses*. 2019;11(1):59. <https://doi.org/10.3390/v11010059>
4. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses — a statement of the Coronavirus Study Group [published online ahead of print, 2020 Feb 07]. *bioRxiv*. 2020.02.07.937862. <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>
5. Ayittey FK, Ayittey MK, Chiwero NB, Kamasah JS, Dzuovor C. Economic impacts of Wuhan 2019-nCoV on China and the world [published online ahead of print, 2020 Feb 12]. *J Med Virol*. 2020. <https://doi.org/10.1002/jmv.25706>
6. Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, et al. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J Virol*. 2012;86(7):3995–4008. <https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>
7. Geng L, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol*. 2020;92:424–32. <https://doi.org/10.1002/jmv.25685>
8. Chen Yu, Qianyun Liu, Guo Deyin. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis [published online ahead of print, 2020 Jan 22]. *J Med Virol*. 2020;92(4):418–23. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>
9. Щелканов МЮ, Колобухина ЛВ, Львов ДК. Коронавирусы человека (Nidovirales, Coronaviridae): возросший уровень эпидемической опасности. *Лечащий врач*. 2013;(10):49–54. [Shchelkanov MY, Kolobukhina LV, Lvov DK. Human coronaviruses (Nidovirales, Coronaviridae): increased level of epidemic danger. *Lechashchii vrach = Therapist*. 2013;(10):49–54 (In Russ.)]
10. Стомба ЛФ, Лебедев ВН, Петров АА, Ручко ВМ, Кулиш ВС, Борисевич СВ. Новый коронавирус человека, вызывающий заболевание человека. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015;(2):68–74. [Stovba LF, Lebedev VN, Petrov AA, Ruchko VM, Kulish VS, Borisevich SV. Emerging coronavirus which gives rise to the disease in humans. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2015;(2):68–74 (In Russ.)]
11. Du L, Yang Y, Zhou Y, Lu L, Li F, Jiang S. MERS-CoV spike protein: a key target for antivirals. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(2):131–43. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1271415>
12. Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S. The spike protein of SARS-CoV — A target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:226–36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2090>
13. Beniac DR, Andonov A, Grudeski E, Booth TF. Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nature Struct Mol Biol*. 2006;13(8):751–2. <https://doi.org/10.1038/nsmb1123>
14. Delmas B, Laude H. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J Virol*. 1990;64(11):5367–75.
15. Nal B, Chan C, Kien F, Siu L, Tse J, Chu K, et al. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *J Gen Virol*. 2005;86(5):1423–34. <https://doi.org/10.1099/10.1099/vir.0.80671-0>
16. Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol*. 2011;174(1):11–22. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.021>
17. DeDiego ML, Álvarez E, Almazán F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, et al. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol*. 2007;81(4):1701–13. <https://doi.org/10.1128/JVI.01467-06>
18. Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Verdía-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2014;10(5):e1004077. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004077>
19. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol*. 2015;1282:1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
20. Chang CK, Sue SC, Yu TH, Hsieh CM, Tsai CK, Chiang YC, et al. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *J Biomed Sci*. 2006;13(1):59–72.
21. Hurst KR, Koetzner CA, Masters PS. Identification of in vivo-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein. *J Virol* 2009;83(14):7221–34. <https://doi.org/10.1128/JVI.00440-09>
22. Cui L, Wang H, Ji Y, Yang J, Xu S, Huang X, et al. The nucleocapsid protein of coronaviruses acts as a viral suppressor of RNA silencing in mammalian cells. *J Virol*. 2015;89(17):9029–43. <https://doi.org/10.1128/JVI.01331-15>
23. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2003;361(9366):1319–25. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13077-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13077-2)
24. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348(20):1967–76. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747>

25. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348:1953–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030781>
26. Hui DS, Zumla A. Severe acute respiratory syndrome. Historical, epidemiologic, and clinical features. *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33(4):869–89. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.07.001>
27. Hui DS, Azhar EI, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis.* 2020;91:264–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.009>
28. Donnelly CA, Ghani AC, Leung GM, Hedley AJ, Fraser C, Riley S, et al. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet.* 2003;361(9371):1761–6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13410-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13410-1)
29. Anderson LJ, Tong S. Update on SARS research and other possibly zoonotic coronaviruses. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(Suppl 1):S21–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.016>
30. Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, et al. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(7):2430–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409608102>
31. Wang M, Yan M, Xu H, Liang W, Kan B, Zheng B, et al. SARS-CoV infection in a restaurant from palm civet. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(12):1860–5. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1112.041293>
32. Martina BE, Haagmans BL, Kuiken T, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Van Amerongen G, et al. SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature.* 2003;425(6961):915. <https://doi.org/10.1038/425915a>
33. Huang YW, Dickerman AW, Pineyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, et al. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *MBio.* 2013;4(5):e00737–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00737-13>
34. Liu C, Tang J, Ma Y, Liang X, Yang Y, Peng G, et al. Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus. *J Virol.* 2015;89(11):6121–5. <https://doi.org/10.1128/JVI.00430-15>
35. Simas PV, Barnabé AC, Duraes-Carvalho R, Neto DF, Caserta LC, Artacho L, et al. Bat coronavirus in Brazil related to appalachian ridge and porcine epidemic diarrhea viruses. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(4):729–31. <https://doi.org/10.3201/eid2104.141783>
36. Lacroix A, Duong V, Hul V, San S, Davun H, Omaliss K, et al. Genetic diversity of coronaviruses in bats in Lao PDR and Cambodia. *Infect Genet Evol.* 2017;48:10–8. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.029>
37. Müller MA, Corman VM, Jores J, Meyer B, Younan M, Liljander A, et al. MERS coronavirus neutralizing antibodies in camels, Eastern Africa, 1983–1997. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(12):2093–5. <https://doi.org/10.3201/eid2012.141026>
38. Meyerholz DK, Lambert AM, McCray PB. Dipeptidyl peptidase 4 distribution in the human respiratory tract: implications for the Middle East Respiratory Syndrome. *Am J Pathol.* 2016;186(1):78–86. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.09.014>
39. Widagdo W, Raj VS, Schipper D, Kolijn K, van Leenders GJLH, Bosch BJ, et al. Differential expression of the Middle East respiratory syndrome coronavirus receptor in the upper respiratory tracts of humans and dromedary camels. *J Virol.* 2016;90(9):4838–42. <https://doi.org/10.1128/JVI.02994-15>
40. Mackay IM, Arden KE. MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Virology.* 2015;12:222. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0439-5>
41. Alraddadi BM, Watson JT, Almarashi GR, Abedi GR, Turkistani A, Sadran M, et al. Risk factors for primary Middle East respiratory syndrome coronavirus illness in humans, Saudi Arabia, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(1):49–55. <https://doi.org/10.3201/eid2201.151340>
42. Yin Y, Wunderink RG. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology.* 2018;23(2):130–7. <https://doi.org/10.1111/resp.13196>
43. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [published online ahead of print, 2020 Feb 03]. *Nature.* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
44. Letko M, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for lineage B β-coronaviruses, including 2019-nCoV [published online ahead of print, 2020 Jan 22]. *bioRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.01.22.915660>
45. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Krueger N, Müller M, Drosten C, Pöhlmann S. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells [published online ahead of print, 2020 Jan 31]. *bioRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.01.31.929042>
46. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China [published online, 2020 Feb 07]. *JAMA.* <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
47. Li X, Zai J, Wang X, Li Y. Potential of large “first generation” human-to-human transmission of 2019-nCoV [published online ahead of print, 2020 Jan 30]. *J Med Virol.* 2020;10.1002/jmv.25693. <https://doi.org/10.1002/jmv.25693>
48. Lu H. Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV) [published online ahead of print, 2020 Jan 28]. *BioSci Trends.* 2020;10.5582/bst.2020.01020. <https://doi.org/10.5582/bst.2020.01020>
49. Wassenaar TM, Zou Y. 2019_nCoV/SARS-CoV-2: Rapid classification of betacoronaviruses and identification of traditional Chinese medicine as potential origin of zoonotic coronaviruses [published online ahead of print, 2020 Feb 14]. *Lett Appl Microbiol.* 2020;10.1111/lam.13285. <https://doi.org/10.1111/lam.13285>
50. Kucharski AJ, Althaus CL. The role of superspreading in Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) transmission. *Euro Surveill.* 2015;20(25):14–8. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.25.21167>
51. Chen J. Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoV—a quick overview and comparison with other emerging viruses [published online ahead of print, 2020 Feb 4]. *Microbes Infect.* 2020;S1286-4579(20)30026-5. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.01.004>
52. Cheng ZJ, Shan J. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know [published online ahead of print, 2020 Feb 18]. *Infection.* 2020;10.1007/s15010-020-01401-y. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01401-y>
53. Liu Y, Gayle AA, Wilder-Smith A, Rocklöv J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus [published online ahead of print, 2020 Feb 13]. *J Travel Med.* 2020;taaa021. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa021>
54. Hui DS, Memish ZA, Zumla A. Severe acute respiratory syndrome vs. the Middle East respiratory syndrome. *Curr Opin Pulm Med.* 2014;20(3):233–41. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000046>

55. Rasmussen SA, Watson AK, Swerdlow DL. Middle East respiratory syndrome (MERS). *Microbiol Spectr.* 2016;4(3):10.1128/microbiolspec.EI10-0020-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EI10-0020-2016>
56. Leung GM, Chung PH, Tsang T, Lim W, Chan SK, Chau P, et al. SARS-CoV antibody prevalence in all Hong Kong patient contacts [published correction appears in *Emerg. Infect. Dis.* 2004 Oct;10(10):1890]. *Emerg. Infect. Dis.* 2004;10(9):1653–6. <https://doi.org/10.3201/eid1009.040155>
57. Badawi A, Ryoo SG. Prevalence of comorbidities in the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2016;49:129–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.06.015>

Об авторах / Authors

Горенков Дмитрий Витальевич. *Dmitry V. Gorenkov.* ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>

Хантимирова Лейсан Маратовна. *Leysan M. Khantimirova.* ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6269-0201>

Шевцов Владимир Александрович, канд. мед. наук. *Vladimir A. Shevtsov, Cand. Sci. (Med.).* ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7164-2890>

Рукавишников Андрей Владимирович, канд. биол. наук. *Andrey V. Rukavishnikov, Cand. Sci. (Biol.).* ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4536-2040>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. *Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor.* ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. *Yuri V. Olefir, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate.* ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7652-4642>

Поступила 03.02.2020

После доработки 27.02.2020

Принята к публикации 14.03.2020

Received 3 February 2020

Revised 27 February 2020

Accepted 14 March 2020

Иммунный ответ при иммунизации противовирусными вакцинами

Н. А. Алпатова*, Ж. И. Авдеева, Л. А. Гайдерова, С. Л. Лысикова, Н. В. Медуницын

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

Обзор посвящен вопросам, связанным с особенностями формирования поствакцинального иммунитета при использовании разных типов противовирусных вакцин, а также проблемам повышения иммуногенности вакцин и эффективности вакцинопрофилактики. Вакцины, содержащие высокоочищенные и рекомбинантные антигены, полученные с помощью современных технологий, характеризуются более низкой реактогенностью и более высоким профилем безопасности, но являются менее иммуногенными по сравнению с живыми вакцинами. Для многих инфекционных вирусных заболеваний до настоящего времени эффективные вакцины не разработаны. Поиск путей усиления иммуногенных свойств вакцин для повышения эффективности вакцинации и разработка новых вакцинных препаратов, обеспечивающих надежную защиту организма от инфекции, являются актуальными. Цель работы — провести анализ особенностей развития иммунного ответа на противовирусные вакцины и подходов к повышению их иммуногенности с помощью адъювантов. Рассмотрены типы противовирусных вакцин, а также особенности развития иммунного ответа в зависимости от природы специфического антигена. Обоснована целесообразность применения адъювантов для усиления и модуляции индуцированного иммунного ответа. Проанализированы механизмы, обуславливающие стимулирующий эффект адъювантов. Обобщены сведения об адъювантах, входящих в состав зарегистрированных вакцин для человека. Обозначена необходимость проведения дальнейших исследований в области повышения эффективности вакцинации, одним из направлений которых является использование в качестве адъювантов лекарственных препаратов на основе рекомбинантных цитокинов человека.

Ключевые слова: вакцины; вирус; иммунитет; адъювант; антитела; Т-клетки; иммуногенность вакцин

Для цитирования: Алпатова НА, Авдеева ЖИ, Гайдерова ЛА, Лысикова СЛ, Медуницын НВ. Иммунный ответ при иммунизации противовирусными вакцинами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(1):21–29. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-21-29>

***Контактное лицо:** Алпатова Наталья Александровна; alpatova@expmed.ru

Immune Response Induced by Immunisation with Antiviral Vaccines

N. A. Alpatova*, Zh. I. Avdeeva, L. A. Gayderova, S. L. Lysikova, N. V. Medunitsyn

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

The review is devoted to specific aspects of the development of post-vaccination immunity following immunisation with different types of antiviral vaccines, as well as to ways of increasing immunogenicity of vaccines and effectiveness of preventive vaccination. Vaccines containing highly purified and recombinant antigens obtained using modern technologies have lower reactogenicity and a higher safety profile, but are less immunogenic compared to live vaccines. Effective vaccines have not been developed for many viral infections yet. Therefore, it is critical to search for ways to enhance immunogenic properties of vaccines in order to increase the efficiency of vaccination, and to develop new vaccine formulations that provide reliable protection of the body against infection. The aim of the paper was to analyse specific aspects of immune response development following immunisation with antiviral vaccines, and approaches to increasing their immunogenicity using adjuvants. It reviews different types of antiviral vaccines, as well as specific aspects of immune response development depending on the nature of a specific antigen. The paper substantiates the use of adjuvants to enhance and regulate the induced immune response. It analyses mechanisms that determine the stimulating effect of adjuvants and summarises data on the adjuvants used in the licensed vaccines for human use. The authors highlight the need for further research to increase the efficiency of vaccination and suggest that one of potential solutions is the use of adjuvants based on recombinant human cytokines.

Key words: vaccines; virus; immunity; adjuvant; antibodies; T cells; vaccine immunogenicity

For citation: Alpatova NA, Avdeeva ZhI, Gayderova LA, Lysikova SL, Medunitsyn NV. Immune response induced by immunisation with antiviral vaccines. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(1):21–29. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-21-29>

***Corresponding author:** Natalia A. Alpatova; alpatova@expmed.ru

Одним из важнейших направлений борьбы с инфекционными заболеваниями в практической медицине в настоящее время остается иммунопрофилактика, которая считается наиболее эффективным и экономически выгодным способом решения проблемы. На фоне возникновения и распространения новых инфекций, а также значительного увеличения частоты хорошо изученной инфекционной патологии актуальность иммунопрофилактики приобретает особое значение. Эффективность вакцинации обеспечивается безопасностью соответствующих вакцин, их способностью формировать напряженный иммунитет и генерировать продолжительную иммунологическую память [1].

Достижения в области биотехнологии позволили создать современные вакцины на основе рекомбинантных антигенов (АГ), содержащих высокоочищенные компоненты, характеризующиеся высоким профилем безопасности. Но иммуногенность вакцин на основе таких АГ снижена по сравнению с вакцинами на основе живых аттенуированных патогенов. Для повышения иммуногенности инактивированных, рекомбинантных, субъединичных вакцин используются адъюванты. Изучение роли адъювантов в активации системы врожденного и адаптивного иммунитета способствует разработке новых вакцин с адъювантами, которые стимулируют иммунный ответ на специфический АГ, а также обеспечивают повышение эффективности вакцинации в конкретных целевых популяциях.

Цель работы — провести анализ особенностей развития иммунного ответа на противовирусные вакцины и подходов к повышению их иммуногенности с помощью адъювантов.

Общие положения

К настоящему моменту против многих инфекционных вирусных заболеваний разработаны различные типы вакцин, которые в зависимости от технологии изготовления можно разделить на следующие группы. В первую группу входят живые вакцины, содержащие аттенуированные или искусственно ослабленные штаммы вирусов. Вакцины, относящиеся ко второй группе, готовят из инактивированных вирусов; к третьей группе относят вакцины, полученные с помощью методов рекомбинантных ДНК или других новых технологий (препараты на основе вирусных белков, экспрессированных *in vitro* в клетках эукариот или прокариот, вакцины из вирусных белков, собранных в вирусоподобные частицы, а также препараты, содержащие вирусные векторы, ДНК-вакцины). К четвертой группе вакцин относятся синтетические полипептидные вакцины [2].

При введении вакцин в организм человека, как и при естественной инфекции, происходит активация системы врожденного иммунитета — первой линии защиты от патогенных микроорганизмов. Врожденный иммунный ответ развивается в течение нескольких часов, является неспецифичным для конкретного патогена и инициирует запуск антигенспецифического адаптивного иммунного ответа. Адаптивный иммунитет также характеризуется формированием иммунологической памяти.

Распознавание вакцинных АГ происходит с помощью Toll-подобных рецепторов (TLRs), которые в основном экспрессируются на клетках системы врожденного иммунитета [3, 4]. После распознавания лигандов с помощью TLRs следует передача в иммунокомпетентную клетку активационного сигнала, трансформируемого в сигнал, который индуцирует экспрессию соответствующих генов. Для индукции генов необходимо образование в клетке ядерных (транскрипционных) факторов, обладающих сродством к определенным последовательностям ДНК и способных связываться с регуляторным участком соответствующих генов [3]. TLRs, которые распознают внеклеточные патогены (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6), передают сигналы, ин-

дуцирующие экспрессию генов провоспалительных цитокинов, а распознающие внутриклеточные (TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9), кроме провоспалительных, индуцируют гены, кодирующие продукцию интерферонов (ИФ), которые способствуют защите от вирусов [3, 5]. Продукты этих генов регулируют реакции врожденного иммунитета и направляют развитие адаптивного иммунного ответа. На рисунке 1 представлена схема передачи сигналов от Toll-подобных рецепторов внутрь клетки [6].

Основная роль в этом процессе принадлежит внутриклеточному TIR-домену, а также связанным с ним адапторным молекулам (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM), которые обеспечивают передачу сигнала от рецептора на каскад серин-треониновых киназ (IKK, MAP-киназа). Последние вызывают активацию факторов транскрипции, таких как NF-κB (ядерный фактор каппа В, транскрипционный фактор провоспалительных генов), AP-1 (фактор для включения различных иммунологически значимых генов), IRF3 (фактор, ответственный за включение генов ИФ), которые участвуют в развитии воспаления и формировании реакций врожденного иммунитета [7–9].

Передача сигналов происходит с участием двух основных сигнальных путей — MyD88-зависимого и TRIF-зависимого. MyD88-зависимый путь участвует в передаче сигнала от всех TLRs, кроме TLR3, использующего TRIF-зависимый путь. От TLR4 сигнал передается с участием обоих сигнальных путей. Следует отметить, что TLRs клеточной мембраны (TLR4 и комплекс TLR1/TLR2/TLR6) принимают участие в активации факторов NF-κB и AP-1; TLRs, экспрессирующиеся на мембранах гранул, ответственны за включение факторов NF-κB, AP-1 и IRF3. Это свидетельствует о том, что TLRs, которые распознают внеклеточные патогены, передают сигналы, индуцирующие экспрессию провоспалительных генов, а распознающие внутриклеточные, кроме провоспалительных, индуцируют гены ИФ, которые участвуют в защите от вирусов [3, 6, 10].

В последние годы большое внимание уделяется изучению механизмов, с помощью которых система врожденного иммунитета участвует в формировании адаптивного иммунного ответа и регулирует степень выраженности, качество и длительность иммунитета, вызванного вакциной.

Особенности развития иммунного ответа на вирусные вакцины

Индукция антигенспецифических ответов Т- и В-клеток требует их активации профессиональными антиген-презентирующими клетками (АПК), которые представляют Т-клеткам комплекс, состоящий из пептида вирусного АГ и продуктов генов гистосовместимости, класса I или II [11]. При распознавании указанного комплекса происходит активация Т-клеток, которые затем пролиферируют и дифференцируются в эффекторные клетки. Выделяют несколько субпопуляций Т-хелперов — Th1, Th2, Th17, T_{reg}-Лф, которые различаются спектром продуцируемых цитокинов, отвечающих за развитие иммунного ответа в определенном направлении. Так, Th1 ответственны за развитие клеточной формы иммунного реагирования, направленной на элиминацию внутриклеточных инфекционных агентов, а Th2 — за развитие гуморальной, направленной против внеклеточных возбудителей инфекции. T_{reg}-Лф после контакта с АПК стимулируют пролиферацию антигенспецифических В-клеток, контролируют переключение синтеза иммуноглобулинов, способствуют формированию иммунологической памяти [3, 11].

Отмечается, что АГ в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса II активирует Th-клетки, это приводит к стимуляции клеточного иммунитета (ответы цитотоксических Т-Лф) и/или гуморального иммунитета (продуци-

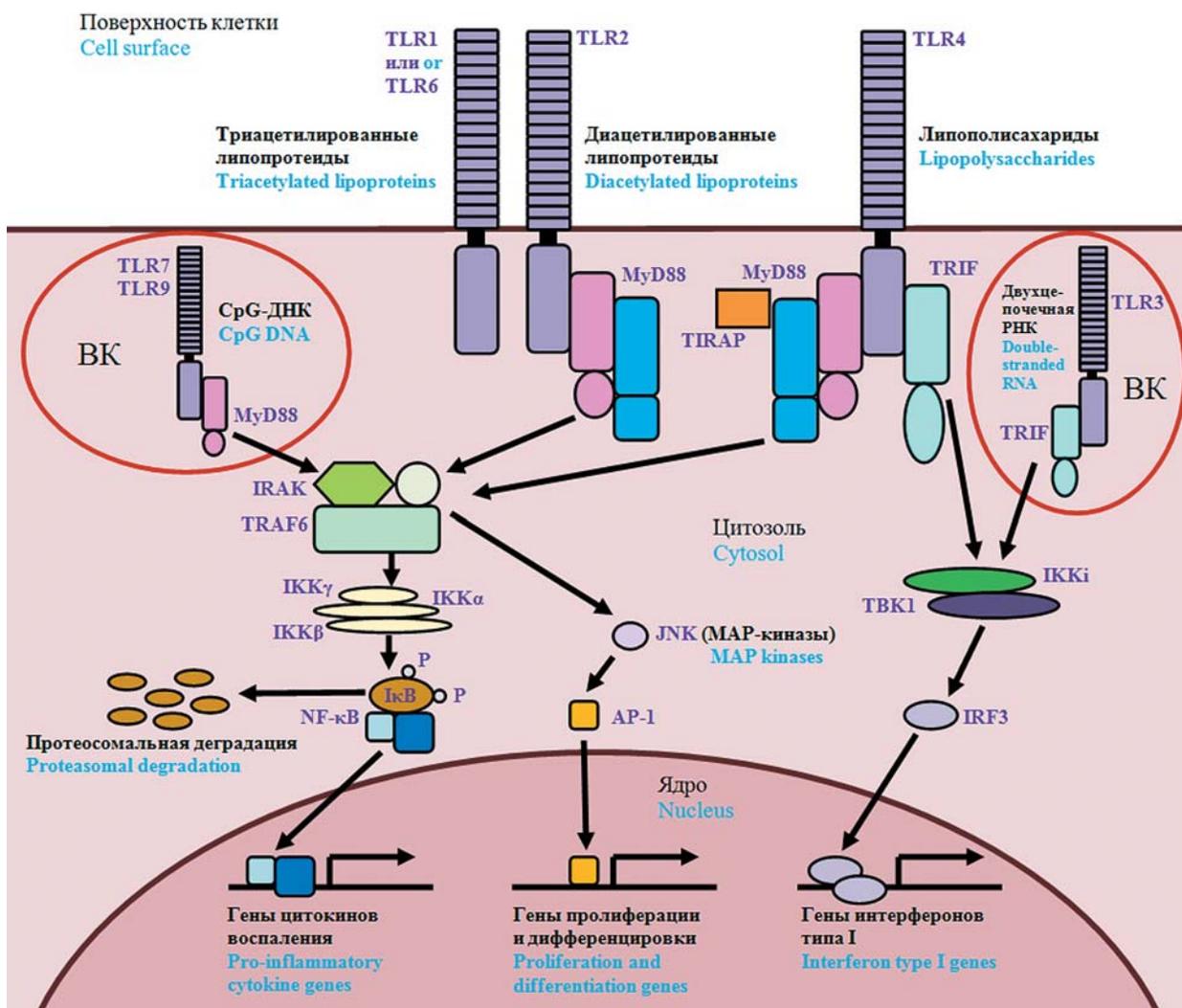


Рис. 1. Пути передачи сигналов от Toll-подобных рецепторов (по Р. М. Хаитову [6] с изменениями). BK — внутриклеточный компартмент.

Fig. 1. Signal pathways from Toll-like receptors (adapted from R. M. Khaitov [6]). BK—intracellular compartment.

рование опсонизирующих и/или нейтрализующих антител (АТ В-клетками). Пептиды АГ в комплексе с молекулами ГКГ класса I могут напрямую стимулировать CD8⁺ Т-Лф, что приводит к развитию реакций клеточного иммунного ответа [12].

На экспериментальной модели иммунизации против гриппа показана значимая роль молекул ГКГ класса II в формировании протективного иммунитета при указанной инфекции. Отмечается, что у мышей с нокаутом генов, кодирующих продукты ГКГ класса II, выявлена более низкая степень продукции протективных АТ по сравнению с мышами, дефицитными в отношении CD4-клеток. Также установлено, что у мышей с нокаутом экспрессии молекул ГКГ класса II на дендритных клетках (ДК) нарушена секреция провоспалительных цитокинов [13]. Одним из важных факторов противовирусного иммунитета является ИФ. Он не оказывает прямого действия на вирус, а усиливает экспрессию АГ ГКГ, вызывает специфическое торможение транскрипции вирусного генома и специфическое подавление трансляции вирусной мРНК, что препятствует накоплению вируса в клетке-мишени [11].

Согласно современным представлениям, для большинства противовирусных вакцин характерно развитие гуморального иммунитета, при котором защита обеспечивается за счет антигенспе-

цифических вируснейтрализующих АТ, направленных на поверхностные АГ вируса. АТ воздействуют непосредственно на вирус или на клетки, инфицированные вирусом, в первом случае происходит нейтрализация вируса, во втором — лизис инфицированных клеток с участием иммунокомпетентных клеток. Для обеспечения продолжительной защиты необходимо как сохранение АТ, так и генерация клеток иммунологической памяти [14].

Однако в ряде случаев гуморальный иммунный ответ не может в полной мере обеспечить защиту от инфекционных агентов. Экспериментальные исследования показали, что гуморальный иммунный ответ при ВИЧ-инфекции играет определенную роль в предотвращении инфицирования, но полную защиту от данной инфекции не обеспечивает. Показано, что ведущую роль в предупреждении и контроле этой инфекции играют клетки типа Th1, CD8⁺ Т-клетки [15, 16]. Однако к настоящему времени эффективные вакцины против указанной инфекции не разработаны.

В некоторых случаях в формировании противовирусного иммунитета основную роль играют клеточные механизмы, связанные прежде всего с действием специфических цитотоксических Т-Лф, а также Т-эффекторов гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Роль специфических клеточных

факторов особенно важна в случае инфекций, при которых вирус недоступен действию АТ [11]. На необходимость разработки вакцин, способствующих формированию Т-клеточного иммунитета, указывает и наличие возбудителей, способных «уклоняться» от эффективного распознавания специфическими АТ. Кроме того, для большинства вакцин характерно формирование как В-, так и Т-клеточно-опосредованного ответа, тем более для развития гуморального иммунитета необходимо участие CD4⁺ Т-клеток, а АТ оказывают влияние на развитие ответа Т-клеток при инфекциях, вызванных внутриклеточными микроорганизмами [17, 18].

Введение живых противовирусных вакцин, которые содержат аттенуированные микроорганизмы, утратившие на генетическом уровне патогенные свойства, но содержащие те же АГ, что и исходный патоген, и сохранившие способность вызывать в организме естественную инфекцию в ослабленной форме, способствует формированию выраженного и длительного иммунитета, по напряженности приближающегося к постинфекционному.

Так, аттенуированные вирусные вакцины (например, против оспы или желтой лихорадки) активируют разные семейства паттерн-распознающих рецепторов (pattern-recognition receptors, PRRs), включая TLRs. Установлено, что вакцина против желтой лихорадки YF-17D, которая является одной из самых эффективных и безопасных живых противовирусных вакцин, активирует несколько групп TLRs на плазматоидных и миелоидных ДК, что стимулирует продукцию ИФ типа I и провоспалительных цитокинов. Кроме того, при введении вакцины YF-17D происходит активация цитозольных рецепторов RIG-I и MDA5, а также транскрипционных факторов, которые регулируют экспрессию ИФ [19]. Вероятно, указанные факторы играют важную роль в развитии раннего ответа системы врожденного иммунитета на вакцину. Отмечается, что при вакцинации YF-17D происходит кратковременная репликация вируса в ДК, что способствует презентации эндогенных эпитопов вируса Т-клеткам [20]. Поливалентный адаптивный иммунный ответ, формирующийся на введение вакцины YF-17D, опосредован Th1- и Th2-клетками, цитотоксическими Т-Лф и вируснейтрализующими АТ [21]. Отмечается, что у отдельных вакцинированных лиц специфические АТ сохраняются в течение 30–35 лет после однократного введения вакцины [21].

При изучении роли различных путей передачи сигналов в развитии иммунного ответа при инфекции и вакцинации показано, что вирус гриппа (одноцепочечный РНК-вирус, из которого получена живая аттенуированная вакцина против гриппа) активирует плазматоидные ДК через TLR7 и миелоидные ДК через адаптерный белок IPS-1, который участвует в передаче сигналов после активации рецептора RIG-I. Отмечается, что развитие раннего ответа системы врожденного иммунитета на вирус гриппа зависит от адаптерных белков MyD88 и IPS-1, участвующих в передаче сигналов внутрь клетки, так как у мышей с дефицитом этих молекул не удалось в полной мере активировать механизмы врожденного иммунитета и вызвать формирование адаптивного иммунного ответа. Установлено, что ответ CD4⁺ Т-клеток и выработка антигенспецифических АТ зависят от MyD88, но являются независимыми от IPS-1. Напротив, индукция антигенспецифического ответа CD8⁺ Т-клеток не нарушается у мышей, дефицитных в отношении MyD88 или IPS-1 [22]. Кроме того, при иммунизации мышей с нокаутом TLR7 и MyD88 инактивированным вирусом гриппа не обеспечивалась защита животных от летальной дозы живого вируса. Авторы подчеркивают, что путь передачи сигналов TLR7-MyD88 играет важную роль в развитии и регуляции протективного иммунного ответа на вирус гриппа А [22]. Результаты данных исследований свидетельствуют о том,

что при введении живых вакцин быстрая активация системы врожденного иммунитета способствует формированию выраженного протективного адаптивного иммунитета и продолжительной иммунологической памяти.

Однако применение живых вакцин имеет некоторые ограничения у лиц с наличием иммунной недостаточности и у беременных женщин, что связано с проблемой безопасности вакцин, обусловленной остаточной вирулентностью вакцинного штамма и возможной реверсией вирулентных свойств за счет мутаций, которые могут привести к восстановлению исходного фенотипа возбудителя инфекции [23].

При введении вакцин на основе инактивированных возбудителей или рекомбинантных АГ репликация микроорганизмов отсутствует, а высокоочищенные компоненты вакцин, как правило, не содержат весь спектр патоген-ассоциированных мембранных структур (pathogen-associated molecular pattern, PAMPs). Следовательно, не происходит активации системы врожденного иммунитета на том уровне, который необходим для формирования выраженного адаптивного иммунитета [24]. В отличие от живых аттенуированных вакцин, на которые формируется пожизненная иммунологическая память, инактивированным рекомбинантным вакцинам в большинстве случаев необходимо введение бустерных доз для поддержания напряженного протективного иммунитета [11, 14]. Кроме того, повышению иммуногенности высокоочищенных, рекомбинантных и синтетических АГ способствует использование адъювантов как путем включения их в состав вакцин, так и при сочетанном применении с вакцинами.

Стимуляция иммунного ответа с помощью адъювантов

В качестве адъювантов могут быть использованы разнообразные вещества природного или синтетического происхождения, которые можно подразделить на минеральные, бактериальные, масляные эмульсии, комбинированные, синтетические, рекомбинантные цитокины и др. При изучении различных веществ в качестве адъювантов большое внимание уделяется оценке их влияния на факторы врожденного иммунитета.

Как правило, адъюванты активируют систему врожденного иммунитета через PRRs, при этом большинство адъювантов с иммуностимулирующей активностью являются лигандами для TLRs. Взаимодействие TLRs с лигандами инициирует активацию сигнальных путей, экспрессию генов цитокинов, хемокинов, костимулирующих молекул. Продукты этих генов регулируют реакции врожденного иммунитета и направляют развитие адаптивного иммунного ответа [24, 25]. Хорошо известным лигандом, активирующим TLR4, является липополисахарид (LPS), поли-(I:C) (полиинозиновая:полицитидиловая кислота) активирует TLR3, флагеллин — TLR5, имидазохинолины — TLR7/8, а CpG-олигодезоксинуклеотиды — TLR9 [26].

Адъюванты также могут активировать цитозольные PRRs, такие как NOD-подобные рецепторы (NLRs), а также RIG-подобные хеликазы (RIG-I, MDA5, LGP2), функция которых состоит в индукции синтеза ИФ типа I, а также провоспалительных цитокинов в ответ на распознавание вирусной РНК [3]. Следовательно, адъюванты, которые имеют структуры, сходные с различными лигандами PRRs, могут активировать соответствующие рецепторы, что приводит к стимуляции системы врожденного иммунитета [27].

С другой стороны, адъюванты могут повышать выраженность адаптивного иммунного ответа, стимулируя Т-клеточный ответ, или гуморальный иммунитет, или оба вида иммунитета. Иммуностимулирующие комплексы (ISCOM) действуют, индуцируя продукцию АТ и сбалансированный иммунный ответ Th1 и Th2, тогда

как монофосфорилированный липид А (MPL) вызывает ответ Th1, а токсин холеры стимулирует ответ Th2 [26, 28].

В настоящее время показано, что отдельные агонисты TLRs, входящие в вакцины в качестве адъювантов, оказывают влияние на поляризацию иммунного ответа, повышают выраженность специфического иммунного ответа и увеличивают его продолжительность [29, 30].

Каждый адъювант имеет свои особенности и реализует свою активность за счет различных механизмов действия, таких как:

- стимуляция процессов поглощения АГ, образование депо в месте инъекции, активация мембранных и внутриклеточных PRRs, включая TLRs;
- индукция секреции цитокинов и хемокинов, участвующих в активации и миграции иммунокомпетентных клеток;
- активация инфламмосомы NLRP3 (способствует запуску воспалительной реакции и секреции провоспалительных цитокинов);
- стимуляция активации и созревания АПК (зрелые ДК экспрессируют более высокий уровень молекул ГКГ и костимулирующих молекул, что способствует эффективной активации Т-клеток);
- влияние на процессинг и презентацию АГ;
- стимуляция миграции ДК в региональные лимфатические узлы, где происходит их взаимодействие с В- или Т-клетками, результатом которого является активация указанных клеток [31–34].

Предполагается, что ограниченная способность вакцин, содержащих высокоочищенные АГ, индуцировать формирование протективного иммунитета связана, в частности, с недостаточной стимуляцией созревания АПК, обеспечивающих взаимодействие между врожденным и адаптивным иммунитетом. Включение адъюванта в вакцину стимулирует поглощение вакцинных АГ АПК, такими как макрофаги (Мф) и ДК, их активацию и созревание. На рисунке 2 представлена схема развития иммунного ответа при введении очищенного АГ вакцины без адъюванта

и с адъювантом. Отражены эффекты адъюванта в месте введения АГ (на уровне активации системы врожденного иммунитета), в лимфатических узлах (на этапе взаимодействия АПК с Т-Лф) и периферических тканях (при развитии адаптивного иммунного ответа и формировании антиген-продуцирующих клеток) [35].

Целесообразность использования адъювантов в вакцинах заключается в повышении иммуногенности АГ, изменении характера иммунного ответа, снижении количества АГ, необходимого для успешной иммунизации, уменьшении кратности введения вакцины и повышении интенсивности иммунного ответа у лиц со сниженной иммунной активностью (пожилые лица, пациенты с хроническими заболеваниями, новорожденные и младенцы) [11, 24]. При выборе адъюванта особое внимание уделяется его способности активировать систему врожденного иммунитета, увеличивать длительность адаптивного иммунного ответа, стимулировать формирование иммунологической памяти.

Применение адъювантов способствует сокращению сроков развития иммунного ответа, повышению интенсивности и увеличению длительности иммунного ответа, усилению иммунологической памяти, повышению уровня протективного иммунитета, снижению дозы антигена и сокращению кратности введения вакцины.

В течение многих лет практически единственными общепризнанными адъювантами были соединения алюминия, и только начиная с 1980-х годов стали применяться новые виды адъювантов, характеризующиеся разными механизмами действия. Проведено большое количество исследований с целью изучения стимулирующей активности и безопасности различных веществ, предполагаемых для использования в качестве адъювантов. В последние годы разработаны новые адъюванты, способствующие не только повышению титров антител, индуцируемых вакциной, но и запуску специфического клеточного иммунного ответа. В таблице 1 представлены

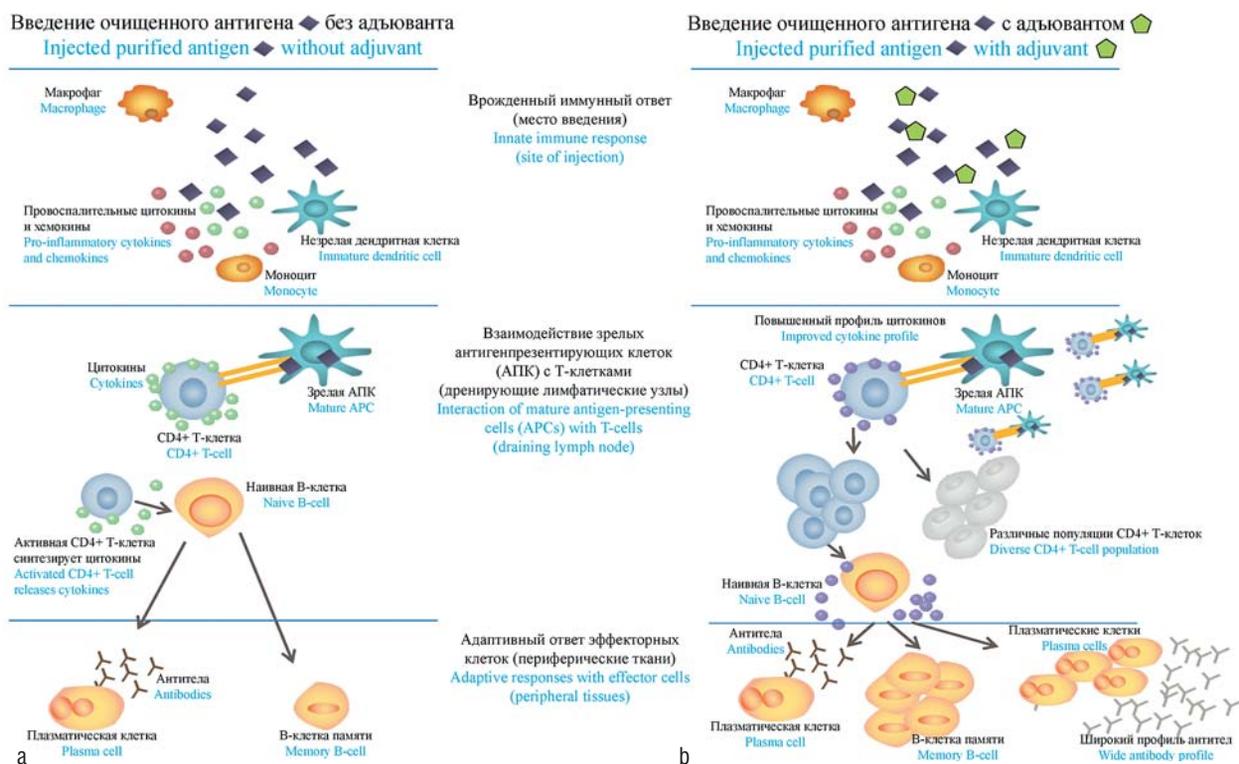


Рис. 2. Схема развития иммунного ответа на введение очищенного антигена вакцины [35]: а — с адъювантом; б — без адъюванта.
Fig. 2. The development pattern of an immune response upon injection of a purified vaccine antigen [35]: a—with an adjuvant; b—without an adjuvant.

Таблица 1. Адьюванты, входящие в состав зарегистрированных вакцин [24, 27, 35–42]
Table 1. The adjuvants used in the licensed vaccines [24, 27, 35–42]

Адьювант Adjuvant	Характеристика адьюванта Adjuvant description	Вакцина, содержащая адьювант Vaccine containing the adjuvant	Адьювантный эффект Adjuvant effect
Соединения алюминия или кальция Aluminium or calcium compounds	Нерастворимые частицы гидроксида, фосфата или гидроксифосфата сульфата алюминия, фосфата кальция, алюминиево-калиевые квасцы Insoluble particles of aluminium hydroxide, aluminium phosphate, or aluminium hydroxyphosphate sulfate, aluminium potassium sulfate	Вакцины календаря прививок и используемые по эпидемическим показаниям (АКДС, АДС-М, против вирусов гепатита А, В, гриппа, полиомиелита, папилломы человека, бешенства и др.) Vaccines included in the Immunisation Schedule and used for epidemic control (DTP, Td, Hepatitis A vaccine, Hepatitis B vaccine, influenza vaccine, polio vaccine, HPV vaccine, rabies vaccine)	Активация системы врожденного иммунитета, стимуляция презентации АГ, гуморального иммунного ответа, повышение стабильности АГ Activation of the innate immunity, stimulation of antigen presentation and of humoral immune response, improvement of antigen stability
MF59, AS03	Масляные диспергированные наноэмульсии «масло в воде» на основе сквалена Squalene-based oil dispersed oil-in-water nanoemulsions	Вакцины против вируса гриппа (H1N1, H1N5, сезонные) Influenza vaccines (H1N1, H1N5, seasonal vaccines)	Индукция развития воспалительной реакции в месте введения АГ, активация АПК и стимуляция их миграции, стимуляция гуморального иммунного ответа, повышение стабильности АГ Induction of inflammatory response at the site of antigen administration, activation of APCs and stimulation of their migration, stimulation of humoral immune response, improvement of antigen stability
AS04	Гидроксид алюминия + монофосфорилированный липид А (MPL) Aluminium hydroxide + monophosphoryl lipid A (MPL)	Вакцины против вирусов гепатита В, папилломы человека Hepatitis B vaccines, HPV vaccine	Активация АПК, стимуляция гуморального и клеточного иммунного ответа Activation of APCs, stimulation of humoral and cell-mediated immune response
AS01	MPL + липосомная суспензия + QS21 (сапонин) MPL + liposome suspension + QS21 (saponin)	Вакцина против малярии Malaria vaccine	Стимуляция доставки и процессинга АГ, гуморального и клеточного иммунного ответа Stimulation of antigen delivery and processing, stimulation of humoral and cell-mediated immune response
Виросомы Virosomes	Диспергированные липидные везикулы, включающие белки мембраны вируса гриппа Dispersed lipid vesicles containing influenza virus membrane proteins	Вакцины против вирусов гриппа, гепатита А Influenza vaccines, Hepatitis A vaccine	Повышение доставки АГ АПК, защита АГ от разрушения в эндосомах, стимуляция гуморального иммунного ответа Improvement of antigen delivery to APCs, antigen protection from degradation in endosomes, stimulation of humoral and cell-mediated immune response
RC-529	Синтетический аналог липида А, агонист TLR4 Synthetic analog of lipid A, TLR4 agonist	Вакцина против гепатита В Hepatitis B vaccine	Стимуляция гуморального иммунного ответа Stimulation of humoral immune response
Полиоксидоний Polyoxidonium	Синтетический полиэлектролит Synthetic polyelectrolyte	Вакцины против гриппа Influenza vaccines	Стимуляция гуморального иммунного ответа Stimulation of humoral immune response
Совидон Sovidon	Сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина Copolymer of N-vinylpyrrolidone and 2-methyl-5-vinylpyridine	Вакцина против гриппа Influenza vaccine	Стимуляция гуморального иммунного ответа Stimulation of humoral immune response
ISS 1018	Олигонуклеотид, агонист TLR9 Oligonucleotide, TLR9 agonist	Вакцина против гепатита В Hepatitis B vaccine	Стимуляция гуморального и клеточного иммунного ответа Stimulation of humoral immune response

Примечание. АПК — антигенпрезентирующие клетки; TLR — Toll-подобный рецептор; АГ — антиген.
Note. APC—antigen-presenting cells; TLR—Toll-like receptor.

адьюванты, которые включены в состав зарегистрированных вакцин для человека в Европе, США и России (против гриппа, гепатита А, гепатита В, вируса папилломы человека, малярии и др.); приведена их характеристика, отражены эффекты, лежащие в основе проявления адьювантного действия [24, 27, 35–42].

В конце 1980-х годов было высказано предположение о возможности использования цитокинов в качестве адьювантов вакцин. Введение определенных цитокинов в сочетании с вакциной может избирательно усиливать протективные механизмы иммунитета, вызывая развитие тех форм иммунного ответа, которые необходимы организму для защиты от конкретного возбудителя инфекции [43]. Результаты экспериментальных исследований по изучению адьювантных свойств цитокинов свидетельствуют о перспективности их использования для оптимизации поствакцинального иммунного ответа на противовирусные вакцины. Эффект влияния цитокинов выражается в повышении интенсивности иммунного ответа, увеличении его длительности и, как следствие, в возможном снижении дозы вакцины [43–48]. Клинических исследований по изучению влияния цитокинов как адьювантов на повышение эффективности вакцинации до настоящего времени проведено немного. В работах ряда авторов указывается, что результаты применения лекарственных препаратов на основе рекомбинантных цитокинов человека (ИЛ-1, ИЛ-2, ИФ α , γ , гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора) при вакцинации против гепатита В лиц, не отвечающих на вакцины, или пациентов с наличием иммунодефицита, свидетельствуют о стимуляции иммунного ответа на вакцину [49–52].

Заключение

Конечной целью вакцинации является создание продолжительной защиты от инфекционных заболеваний. Эффективная вакцина должна вызывать активацию системы врожденного иммунитета, индуцировать выработку АТ и эффекторных Т-клеток, специфичных к эпитопам АГ возбудителя, обеспечивающих защиту от инфекции. Одной из наиболее важных стратегий для разработки новых эффективных вакцин является выбор и использование подходящих адьювантов, стимулирующих формирование специфического иммунитета. Адьюванты не требуются для живых аттенуированных вакцин, при введении которых возможна репликация микроорганизмов, способствующая развитию адекватного иммунного ответа. Для инактивированных вакцин и вакцин, содержащих очищенные антигены других типов, использование адьювантов целесообразно в связи с тем, что благодаря своей способности активировать ответ системы врожденного иммунитета адьюванты повышают выраженность адаптивного иммунного ответа, усиливают иммунологическую память, что позволяет уменьшить кратность введения вакцин или снизить иммунизирующую дозу АГ. Адьюванты также способствуют формированию более напряженного иммунитета у лиц, обычно характеризующихся низким уровнем иммунного ответа (например, у пожилых людей или лиц с наличием иммунодефицита).

Изучение механизмов, способствующих развитию эффективной защиты от патогенов, и способов стимулирования защитных реакций организма путем воздействия на систему врожденного и адаптивного иммунитета, в том числе и с помощью адьювантов, является ключевым направлением исследований в области повышения эффективности вакцинации.

Вклад авторов. *Н. А. Алпатова* — написание, доработка текста; *Ж. И. Авдеева* — окончательное утверждение версии рукописи для публикации; *Л. А. Гайдерова* — концепция и дизайн исследования; *С. Л. Лыскова* — сбор и систематизация данных; *Н. В. Медуницын* — идея исследования, интерпретация результатов исследования.

Authors' contributions. *Natalia A. Alpatova*—writing, revising the text; *Zhanna I. Avdeeva*—final approval of the version to be published; *Lidia A. Gayderova*—research concept and design; *Svetlana L. Lysikova*—data collection and systematization; *Nikolay V. Medunitsyn*—idea planning, interpretation of research results.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicity funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

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

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

Литература/References

- Петров РВ, Хаитов РМ. *Иммуногены и вакцины нового поколения*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. [Petrov RV, Khaitov RM. *Immunogens and vaccines of the new generation*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011 (In Russ.)]
- Зверев ВВ, Юминова НВ. Вакцинопрофилактика вирусных инфекций от Э. Дженнера до настоящего времени. *Вопросы вирусологии*. 2012;(S1):33–42. [Zverev VV, Yuminova NV. Vaccines. Prevention of viral infections from E. Jenner to date. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2012;(S1):33–42 (In Russ.)]
- Ярилин АА. *Иммунология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010. [Yarilin AA. *Immunology*. Moscow: GEOTAR-Media; 2010 (In Russ.)]
- Хаитов РМ, Пашченков МВ, Пинегин БВ. Роль паттерн-распознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете. *Иммунология*. 2009;30(1):66–76. [Khaitov RM, Pashchenkov MV, Pinegin BV. The role of pattern-recognizing receptors in congenital and active immunity in innate and adaptive immunity. *Immunologiya = Immunology*. 2009;30(1):66–76 (In Russ.)]
- Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(2):240–73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
- Хаитов РМ. *Иммунология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. [Khaitov RM. *Immunology*. Moscow: GEOTAR-Media; 2013 (In Russ.)]
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11:373–84. <http://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J*. 2009;420(1):1–16. <http://doi.org/10.1042/BJ20090272>
- Lipinska-Gediga M. Innate Response to Infection. *J Clin Cell Immunol*. 2013;S13:008. <http://doi.org/10.4172/2155-9899.S13-008>
- Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*. 2011;3(6):920–40. <http://doi.org/10.3390/v3060920>

11. Медуницын НВ, Миронов АН, Мовсесянц АА. *Теория и практика вакцинологии*. М.: Ремедиум; 2015. [Medunitsyn NV, Mironov AN, Movsesyants AA. *Theory and practice of vaccinology*. Moscow: Remedium; 2015 (In Russ.)]
12. Skwarczynski M, Toth I. Peptide-based synthetic vaccines. *Chem Sci*. 2016;7(2):842–54. <http://doi.org/10.1039/c5sc03892h>
13. O E, Lee YT, Ko EJ, Kim KH, Lee YN, Song JM, et al. Roles of major histocompatibility complex class II in inducing protective immune responses to influenza vaccination. *J Virol*. 2014;88(14):7764–75. <https://doi.org/10.1128/JVI.00748-14>
14. Plotkin SA. Correlates of vaccine-induced immunity. *Clin Infect Dis*. 2008;47(3):401–9. <http://dx.doi.org/10.1086/589862>
15. Zepp F. Principles of vaccination. *Methods Mol Biol*. 2016;1403:57–84 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7_3
16. Orenstein WA, Seib K, Graham-Rowe D, Berkley S. Contemporary vaccine challenges: improving global health one shot at a time. *Sci Transl Med*. 2014;6(253):253ps11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009848>
17. Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(7):1055–65. <https://doi.org/10.1128/CVI.00131-10>
18. Griffiths KL, Khader SA. Novel vaccine approaches for protection against intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol*. 2014;28:58–63. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.02.003>
19. Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med*. 2006;203(2):413–24. <https://doi.org/10.1084/jem.20051720>
20. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol*. 2009;10(1):116–25. <https://doi.org/10.1038/ni.1688>
21. Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30–35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ*. 1981;59(6):895–900.
22. Koyama S, Ishii KJ, Kumar H, Tanimoto T, Coban C, Uematsu S, et al. Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination. *J Immunol*. 2007;179(7):4711–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4711>
23. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Ann Med*. 2018;50(2):110–20. <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1407035>
24. Bastola R, Noh G, Keum T, Bashyal S, Seo JE, Choi J, et al. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Arch Pharm Res*. 2017;40(11):1238–48. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0969-z>
25. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010;33(4):492–503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
26. Apostólico JS, Lunardelli VA, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: classification, *modus operandi*, and licensing. *J Immunol Res*. 2016;2016:1459394. <https://doi.org/10.1155/2016/1459394>
27. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol*. 2011;12(6):509–17. <https://doi.org/10.1038/ni.2039>
28. Lee S, Nguyen MT. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw*. 2015;15(2):51–7. <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.2.51>
29. Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine*. 2011;29(17):3341–55. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.002>
30. Tikhvatulin AI, Dzharrullaeva AS, Tikhvatulina NM, Shcheblyakov DV, Shmarov MM, Dolzhikova IV, et al. Powerful complex immunoadjuvant based on synergistic effect of combined TLR4 and NOD2 activation significantly enhances magnitude of humoral and cellular adaptive immune responses. *PLoS One*. 2016; 11(5):e0155650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155650>
31. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol*. 2013;4:114. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00114>
32. Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(30):10501–06. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804699105>
33. Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med*. 2013;19(12):1597–608. <https://doi.org/10.1038/nm.3409>
34. Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM. Correlates of adjuvanticity: a review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin Immunol*. 2018;39:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001>
35. Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines*. 2015;3(2):320–43. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020320>
36. Wagner R, Hildt E. Composition and mode of action of adjuvants in licensed viral vaccines. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2019;62(4):462–71. <https://doi.org/10.1007/s00103-019-02921-1>
37. Moyer TJ, Zmolek AC, Irvine DJ. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *J Clin Invest*. 2016;126(3):799–808. <https://doi.org/10.1172/JCI81083>
38. Rambe DS, Giudice GD, Rossi S, Sanicas M. Safety and mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *International Current Pharmaceutical Journal*. 2015;4(8):420–31. <https://doi.org/10.3329/icpj.v4i8.24024>
39. Kazmin D, Nakaya HI, Lee EK, Johnson MJ, van der Most R, van den Berg RA, et al. Systems analysis of protective immune responses to RTS,S malaria vaccination in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(9):2425–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621489114>
40. Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 2010;28(Suppl 3):C25–36. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.021>
41. Хантими́рова ЛМ, Козлова ТЮ, Постнова ЕЛ, Шевцов ВА, Рукавишников АВ. Ретроспективный анализ заболеваемости вирусным гепатитом В населения Российской Федерации с 2013 по 2017 г. в аспекте вакцинопрофилактики. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(4):225–35. [KhanTimirova LM, Kozlova TYu, Postnova EL, Shevtsov VA, Rukavishnikov AV. Retrospective analysis of viral hepatitis B incidence in Russia from 2013 to 2017 in the context of preventive vaccination. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(4):225–35 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-225-235>
42. Laupèze B, Hervé C, Di Pasquale A, Tavares Da Silva F. Adjuvant systems for vaccines: 13 years of post-licensure experience in diverse populations have progressed the way adjuvanted vaccine safety is investigated and understood. *Vaccine*. 2019;37(38):5670–80. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.098>
43. Nunberg JH, Doyle MV, York SM, York CJ. Interleukin 2 acts as an adjuvant to increase the potency of inactivated rabies virus vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(11):4240–3. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.11.4240>
44. Ben-Sasson SZ, Caucheteux S, Crank M, Hu-Li J, Paul WE. IL-1 acts on T cells to enhance the magnitude of *in vivo* immune responses. *Cytokine*. 2011;56(1):122–5. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.07.006>

45. Li Y, Zhou M, Luo Z, Zhang Y, Cui M, Chen H, et al. Overexpression of interleukin-7 extends the humoral immune response induced by rabies vaccination. *J Virol.* 2017;91(7):e02324-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02324-16>
46. Gai W, Zheng W, Wang C, Wong G, Song Y, Zheng X. Immunization with recombinant rabies virus expressing Interleukin-18 exhibits enhanced immunogenicity and protection in mice. *Oncotarget.* 2017;8(53):91505-15. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21065>
47. Ju B, Li D, Ji X, Liu J, Peng H, Wang S, et al. Interleukin-21 administration leads to enhanced antigen-specific T cell responses and natural killer cells in HIV-1 vaccinated mice. *Cell Immunol.* 2016;303:55-65. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.03.006>
48. Grasse M, Meryk A, Miggitsch C, Grubeck-Loebenstien B. GM-CSF improves the immune response to the diphtheria-component in a multivalent vaccine. *Vaccine.* 2018;36(31):4672-80. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.033>
49. Toporovski R, Morrow MP, Weiner DB. Interferons as potential adjuvants in prophylactic vaccines. *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10(10):1489-500. <https://doi.org/10.1517/14712598.2010.521495>
50. Симбирцев АС, Петров АВ, Пигарева НВ, Николаев АТ. Новые возможности применения рекомбинантных цитокинов в качестве адъювантов при вакцинации. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2011;(1):16-20. [Simbirtsev AS, Petrov AV, Pigareva NV, Nikolaev AT. New opportunities for using recombinant cytokines as adjuvants for vaccination. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2011;(1):16-20 (In Russ.)]
51. Miquilena-Colina ME, Lozano-Rodríguez T, García-Pozo L, Sáez A, Rizza P, Capone I, et al. Recombinant interferon- α 2b improves immune response to hepatitis B vaccination in haemodialysis patients: results of a randomised clinical trial. *Vaccine.* 2009;27(41):5654-60. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.014>
52. Yağci M, Acar K, Sucak GT, Yamaç K, Haznedar R. Hepatitis B virus vaccine in lymphoproliferative disorders: a prospective randomized study evaluating the efficacy of granulocyte-macrophage colony stimulating factor as a vaccine adjuvant. *Eur J Haematol.* 2007;79(4):292-6. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2007.00912.x>

Об авторах / Authors

Алпатова Наталья Александровна, канд. биол. наук. *Natalia A. Alpatova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6807-508X>

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф. *Zhanna I. Avdeeva*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9377-1378>

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук. *Lidia A. Gayderova*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Лысикова Светлана Леонидовна, канд. мед. наук. *Svetlana L. Lysikova*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7864-8972>

Медуницын Николай Васильевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН. *Nikolay V. Medunitsyn*, Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the RAS. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3937-5208>

Поступила 05.09.2019

После доработки 16.01.2020

Принята к публикации 14.02.2020

Received 5 September 2019

Revised 16 January 2020

Accepted 14 February 2020

Аспекты клинических исследований препаратов для лечения гемофилии

Ж. И. Авдеева^{1,*}, А. А. Солдатов¹, В. П. Бондарев¹, В. А. Меркулов^{1,2}

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

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

Гемофилия — орфанное заболевание, обусловленное недостаточностью или полным отсутствием соответствующих факторов свертывания крови за счет мутации генов, кодирующих их синтез. Пациентам с гемофилией требуется проведение постоянной заместительной терапии препаратами факторов свертывания крови, полученными с использованием технологии рекомбинантных ДНК или из плазмы крови доноров. При разработке новых препаратов и усовершенствовании технологии производства ранее утвержденных лекарственных препаратов проводятся клинические исследования, требующие включения как ранее леченных, так и ранее не леченных пациентов различных возрастных групп. Цель работы — аналитический обзор основных требований к проведению клинических исследований лекарственных препаратов фактора свертывания крови IX на основе обновленных документов Европейского агентства по лекарственным средствам. Приведены основные принципы проведения клинических исследований препаратов фактора IX, представляемых для регистрации как «новые» препараты, с учетом рекомендаций, приведенных в отечественных и международных документах, включая обновленный документ Европейского агентства по лекарственным средствам. Отражены вопросы, связанные с безопасностью препаратов, которые обусловлены проявлением «нежелательной» иммуногенности, приводящей к формированию ингибиторов, провоцирующих развитие аллергических реакций или снижение эффективности терапии. Гармонизация требований к проведению клинических исследований при разработке и обновлении отечественных документов на основании анализа опыта применения лекарственных препаратов, используемых для лечения гемофилии, а также новые научные достижения в изучении указанной патологии будут способствовать внедрению в медицинскую практику современных препаратов для успешной терапии гемофилии.

Ключевые слова: гемофилия; препараты фактора IX рекомбинантные; препараты фактора IX, полученные из плазмы крови; клинические исследования; эффективность; безопасность; иммуногенность; ингибиторы

Для цитирования: Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Бондарев ВП, Меркулов ВА. Аспекты клинических исследований препаратов для лечения гемофилии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(1):30–41. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-30-41>

Контактное лицо: Авдеева Жанна Ильдаровна; Avd-cytok@yandex.ru

General Considerations on Clinical Trials of Hemophilia Medicines

Zh. I. Avdeeva^{1,*}, A. A. Soldatov¹, V. P. Bondarev¹, V. A. Merkulov^{1,2}

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

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

Hemophilia is an orphan disease associated with deficiency or complete lack of certain blood coagulation factors due to mutation of genes encoding their synthesis. Patients with hemophilia need continuous replacement therapy with coagulation factor products which are produced by recombinant DNA technology or derived from donated blood plasma. The development of new products or improvement of the production process of already authorised medicinal products involve clinical trials that have to include both previously treated and untreated patients of different age groups. The aim of the paper was to perform an analytical review of general hemophilia issues and major requirements for clinical trials of coagulation factor IX products based on the updated documents of the European Medicines Agency. The paper summarises the basic principles of conducting clinical trials of coagulation factor IX products that are submitted for marketing authorisation as “new” products, based on recommendations of Russian and international regulatory documents, including the updated guideline of the European Medicines Agency. It sums up product safety issues associated with undesirable immunogenicity resulting in formation of inhibitors that provoke allergic reactions or reduce the effectiveness of therapy. The harmonisation of the requirements for clinical trials during preparation and updating of documents by Russian manufacturers should

be based on the analysis of the experience with hemophilia products and latest scientific achievements in the disease treatment. In that case it will facilitate the introduction of innovative efficacious hemophilia products into clinical practice.

Key words: hemophilia; recombinant factor IX products; plasma-derived factor IX products; clinical trial; efficacy; safety; immunogenicity; inhibitors

For citation: Avdeeva Zhl, Soldatov AA, Bondarev VP, Merkulov VA. General considerations on clinical trials of hemophilia medicines. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(1):30–41. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-30-41>

Corresponding author: Zhanna I. Avdeeva; Avd-cytok@yandex.ru

Частота встречаемости гемофилии, одного из тяжелых орфанных заболеваний, составляет приблизительно 1 случай на 10 000 новорожденных. Общее количество пациентов с гемофилией в мировом масштабе по оценке Всемирной федерации гемофилии (ВФГ) составляет приблизительно 400 000 человек¹. Пациентам с гемофилией требуется проведение постоянной заместительной терапии препаратами факторов свертывания крови.

Благодаря достижениям биотехнологии для лечения пациентов с гемофилией используют не только препараты, полученные из плазмы крови доноров, но и препараты, произведенные с использованием технологии рекомбинантных ДНК. При разработке «новых» лекарственных препаратов проводятся клинические исследования, в ряде случаев клинические исследования требуются и при внесении изменений в технологию производства ранее зарегистрированных препаратов.

Цель работы — аналитический обзор основных требований к проведению клинических исследований лекарственных препаратов фактора свертывания крови IX на основе обновленных документов Европейского агентства по лекарственным средствам.

Общая характеристика заболевания

Гемофилия обусловлена наследственной патологией системы гемостаза, что проявляется нарушением процесса тромбопластинообразования в системе свертывания крови. Причиной нарушения является мутация генов в X-хромосоме, кодирующих факторы свертывания крови, что приводит к снижению или полному отсутствию синтеза коагулирующих факторов — VIII, IX или XI.

Гемофилия наследуется по рецессивному признаку, сцепленному с полом. При этом гемофилией заболевают лица мужского пола в случае наследования патологически измененной X-хромосомы матери. Согласно современным представлениям в одной трети случаев заболевание развивается у лиц без отягощенной наследственности в том случае, если у матери отсутствуют повреждения X-хромосомы. При этом причиной заболевания является спонтанная мутация генов, кодирующих синтез факторов свертывания крови VIII или IX². Подробные сведения о данной патологии приведены в указанных руководствах, сообщениях отечественных и зарубежных авторов [1–6].

Выделяют три формы заболевания в зависимости от тяжести клинических проявлений, обусловленные степенью нарушения коагуляционной активности плазменных факторов свертывания крови:

- тяжелая форма (уровень активности фактора свертывания крови составляет менее 1%); 60–70% всех диагностируемых случаев гемофилии протекает в тяжелой форме; признаки заболевания, характеризующиеся развитием тяжелого геморрагического синдрома, появляются уже в раннем возрасте, на-

чиная с первых дней и месяцев жизни ребенка (кровотечения из пупочной раны, в местах инъекций, из десен при прорезывании и смене молочных зубов и т. д.);

- умеренная (среднетяжелая) форма (уровень активности фактора свертывания крови составляет 1–5%); как правило, клинические симптомы, характерные для гемофилии, развиваются в дошкольном возрасте; геморрагический синдром выражен умеренно; кровоизлияния в мышцы и суставы, обширные гематомы развиваются в результате травм; обострения заболевания наблюдаются 2–3 раза в год;

- легкая форма (уровень активности фактора свертывания крови составляет более 5%); как правило, клинические симптомы возникают в школьном возрасте; кровотечения появляются только после полученных травм или при медицинском вмешательстве (хирургические операции); обычно кровотечения более редкие и менее интенсивные.

Кроме форм тяжести клинических симптомов выделяют три типа гемофилии:

- гемофилия типа А (классический тип) встречается у 85% всех пациентов; заболевание обусловлено дефицитом фактора свертывания крови VIII;

- гемофилия типа В встречается у 13% всех пациентов; обусловлена недостаточной активностью фактора свертывания крови IX (плазменного компонента тромбопластина, фактора Кристмаса), участвующего в образовании активной тромбокиназы в I фазе свертывания крови, что приводит к нарушению формирования вторичной коагуляционной пробки;

- гемофилия типа С считается самым редко встречающимся типом заболевания, выявляется с частотой 1–2%; обусловлена недостаточностью синтеза фактора свертывания крови XI (предшественника тромбопластина).

Клиническая симптоматика указанных типов гемофилии одинакова, однако для дифференциальной диагностики и выбора лекарственных препаратов необходимо лабораторное подтверждение наличия дефицита факторов свертывания крови VIII или IX.

Фактор свертывания крови IX — фактор Кристмаса, антигемофильный α -глобулин В. Синтезируется в печени в виде неактивного белка-предшественника, который подвергается множественным посттрансляционным модификациям, секретируется в кровоток после протеолитического отщепления пропептида. Ген фактора IX расположен на X-хромосоме (Xq27.1-q27.2). Содержание фактора IX в плазме составляет около 0,005 г/л. Период полужизни в крови — 1,0–1,3 сут. Процент активности фактора IX в нормальной плазме составляет 70–130. Минимальный уровень, необходимый для гемостаза, — 20–30% [7].

Фактор IX принимает активное участие в первой фазе (протромбиназообразование) плазменного гемостаза, активиру-

¹ Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*. 2013;19(1):e1–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x>

² Воробьев АИ, Андреев ЮН, Баркаган ЗС, Буланов АЮ. Руководство по гематологии. 3-е издание. Том 3. М.: Ньюдиамед; 2005.

Рукавицын ОА, ред. Гематология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017.

ется факторами XIa, VIIIa. Являясь проферментом сериновой протеазы, активирует фактор X в комплексе с фактором VIII, ионами Ca²⁺ и фактором 3 тромбоцитов. В процессе свертывания крови фактор IX не потребляется. Фактор IX термостабилен, длительно сохраняется в плазме и сыворотке крови.

При отсутствии фактора IX развивается гемофилия В. При заболеваниях печени, таких как гепатиты, цирроз печени и др., отмечают снижение в крови содержания фактора IX. Аналогичные изменения наблюдают у пациентов, принимающих производные дикумарина и индадиола. Кровотечения при острых заболеваниях печени в большинстве случаев также связывают с дефицитом фактора IX. Однако недостаток фактора IX обнаруживается не только при заболеваниях печени, но также при болезни Гоше и у лиц с нефротическим синдромом.

Мутация гена, кодирующего синтез фактора IX, находящегося в локусе X-хромосомы, наблюдается в 7–10 раз реже, чем мутация гена фактора VIII. В связи с этим гемофилия В (болезнь Кристмаса) наблюдается значительно реже (приблизительно в 4 раза), чем гемофилия А³. Тяжелая форма гемофилии В, требующая регулярной заместительной терапии, встречается с частотой 1 случай на 30 000 мужчин, что составляет около 20% всех пациентов с гемофилией. E. I. Rogaev с соавт. [8] установили, что у представителей европейских королевских семей была именно гемофилия В и последний предполагаемый носитель заболевания скончался в 1940 г. В данной группе семей заболевание было обусловлено точечной мутацией, которая привела к нарушению сплайсинга мРНК фактора IX и вызвала появление альтернативной укороченной формы белка. В некоторых случаях мутации в области промотора гена фактора IX приводят к менее тяжелой форме заболевания, гемофилии В «Лейден», характеризующейся почти полным отсутствием фактора IX в детстве и устойчивым увеличением его уровня в период полового созревания до близких к норме значений [9].

Препараты, используемые для лечения гемофилии

Поскольку гемофилия относится к патологии наследственных геморрагических коагулопатий, что, как правило, связано с генетически детерминированным дефицитом активности факторов свертывания крови, основным видом лечения является заместительная терапия препаратами факторов свертывания крови. Это позволяет сохранить жизнь, трудоспособность и обеспечивает достойное качество жизни пациентов.

Для лечения гемофилии используют препараты, получаемые из плазмы крови доноров (концентраты на основе плазмы крови), и биотехнологические препараты.

Препараты, получаемые из плазмы крови доноров

Первым был зарегистрирован в 1966 г. лекарственный препарат фактора VIII, полученный из плазмы крови доноров, позднее зарегистрированы другие препараты факторов свертывания крови. Несмотря на успешность их клинического применения, они могут быть причиной инфицирования пациентов вирусами ВИЧ, гепатита В, гепатита С и др. Об этом свидетельствовали сообщения о заражении около 20 000 человек, получивших препараты плазменного происхождения в качестве заместительной терапии. Это потребовало совершенствования технологии производства, внедрения современных способов элиминации и инактивации вирусов. Предпринятые меры по снижению факторов риска возможного инфицирования пациентов были успешными, и с конца 1980-х годов случаев

инфицирования препаратами плазменного происхождения не зафиксировано.

Для обеспечения вирусной безопасности лекарственных препаратов должны быть соблюдены строгие требования, предъявляемые к производству любых биологических, в том числе и биотехнологических лекарственных препаратов, а также дополнительные требования, касающиеся препаратов, получаемых из крови человека. Вопросы, связанные с обеспечением безопасности указанных препаратов, отражены в международных и отечественных документах⁴, а также в работах ряда авторов [10–13].

Вирусная безопасность препаратов, получаемых из плазмы крови человека, включая препараты факторов свертывания крови, обеспечивается за счет тщательного отбора доноров, проведения исследований на выявление маркеров вирусных инфекций в образцах индивидуальных донаций и пулов плазмы крови. Также совершенствуются и разрабатываются новые тест-системы, используемые для серологической диагностики, и технологии амплификации нуклеиновых кислот при обнаружении вирусных ДНК и РНК, что способствует сокращению «периода серологического окна», в течение которого невозможно выявить инфекционный донорский материал.

Основными контаминантами, ассоциированными с лекарственными препаратами крови человека, являются такие гемотрансмиссивные вирусы, как вирусы гепатитов В, С, А, вирус иммунодефицита человека 1 и 2 типов, парвовирус В19 и любые другие новые вирусы, а также прочие агенты. В ряде случаев указанные вирусы могут приводить как к острой, так и к персистирующей или латентной инфекции.

Современные технологии, позволяющие включать в производственный процесс эффективные стадии очистки, обеспечивают полноту инактивации и/или элиминации потенциальных вирусов. На этапах производственного процесса используют способы очистки, обладающие различными механизмами действия, с целью эффективного воздействия на широкий диапазон вирусов, характеризующихся разными физико-химическими свойствами. Обязательным элементом выполнения указанных процедур является проведение валидации процессов инактивации и/или элиминации вирусов.

Используемые в производстве способы инактивации и/или элиминации вирусов в настоящее время считаются высокоэффективными и обеспечивают вирусную безопасность препаратов в отношении широкого спектра оболочечных вирусов (ВИЧ, вирусы гепатитов В и С). Однако они менее эффективны в отношении безоболочечных вирусов, таких как вирус гепатита А и парвовирус В19. При проведении клинических исследований безопасность препаратов в отношении безоболочечных вирусов не может быть адекватно оценена и полностью обеспечена. Это требует продолжения тщательного наблюдения за пациентами, участвовавшими в клиническом исследовании лекарственного препарата, и после окончания исследования. С этой целью должна быть разработана система сбора информации о пациентах, получающих препарат, которая позволит быстро реагировать на любые сообщения о развитии инфекционного заболевания у пациента с последующим полным исследованием причины заболевания для подтверждения или исключения возможности заражения за счет введения лекарственного препарата.

Необходимо отметить, что плазменные препараты фактора IX могут содержать другие коагуляционные факторы, такие

³ Воробьев АИ, Андреев ЮН, Баркаган ЗС, Буланов АЮ. Руководство по гематологии. 3-е издание. Том 3. М.: Ньюдиамед; 2005.

⁴ Guidance on plasma-derived medicinal products (EMA/CHMP/BWP/706271/2010). EMA; 2011.

как факторы II, VII и X. Их присутствие в лекарственном препарате связано с потенциальным риском развития тромбозов. В связи с этим особенно важным является соблюдение требований правил надлежащей производственной практики (GMP) в процессе производства препаратов факторов свертывания крови, что позволяет обеспечить чистоту, отсутствие тромбогенных примесей, а также снижение иммуногенного потенциала препаратов.

Биотехнологические лекарственные препараты

Одновременно с совершенствованием технологии получения препаратов из крови доноров проводились исследования по разработке препаратов факторов свертывания на основе технологии рекомбинантных ДНК. Препарат рекомбинантного фактора свертывания крови IX был зарегистрирован в 1997 г. Использование препаратов факторов свертывания крови на основе рекомбинантных белков исключает возможность инфицирования пациентов вирусами, поскольку безопасность биотехнологических лекарственных препаратов обеспечивается путем включения в производственный процесс эффективных стадий инактивации и/или элиминации потенциальных вирусов. Основные принципы, обеспечивающие вирусную безопасность в процессе производства таких препаратов, изложены в отечественных и международных документах⁵.

Поскольку производство рекомбинантных препаратов базируется на использовании нечеловеческих клеточных линий, не исключена вероятность присутствия в них различных контаминантов. Однако строгое соблюдение установленных требований к характеристике и оценке качества штаммов-продуцентов рекомбинантного белка обеспечивает получение препаратов надлежащего качества. При производстве биотехнологических лекарственных препаратов большое внимание уделяется вопросам очистки целевого белка, так как возможное присутствие гетерологичных белков, относящихся к производственным примесям, так же как и изменение структурных характеристик рекомбинантного белка, повышает иммуногенный потенциал препаратов.

Проявления «нежелательной» иммуногенности препаратов

Биологические лекарственные препараты, действующим веществом которых являются белки или гликопротеины, используемые для лечения хронических заболеваний, вводятся пациентам длительно, что часто сопровождается формированием специфических антител (АТ). При гемофилии проблемы, связанные с «нежелательной» иммуногенностью как рекомбинантных, так и плазменных препаратов факторов свертывания крови, требуют особого внимания, поскольку данные препараты используются в качестве заместительной терапии.

Формирование специфических АТ к препарату, определяемых термином ингибиторы, приводит к снижению или потере специфической активности факторов свертывания, что проявляется отсутствием клинического ответа на стандартную терапию, развитием кровотечений на фоне профилактического приема препаратов или развитием побочных реакций, в том числе и аллергических. Формирование ингибиторов считается самым тяжелым осложнением при лечении гемофилии.

У пациентов с тяжелой формой гемофилии В АТ выявляются приблизительно у 3–5% пациентов. При этом в 1,5–3% слу-

чаев наблюдается формирование высоких титров АТ, нейтрализующих фактор IX, что проявляется существенным снижением эффективности лечения. Большая вероятность формирования специфических АТ к препарату у пациентов с гемофилией В ассоциируется с мутациями и со значительной или полной делецией гена фактора IX, которую отмечают у 50% пациентов с ингибиторами. Пациенты с полной делецией генов подвергаются наибольшему риску развития тяжелых аллергических реакций, вплоть до анафилаксии. Отмечают, что до 50% пациентов с наличием ингибиторов подвержены риску развития тяжелых аллергических реакций и анафилаксии [14–16].

Для индукции иммунологической толерантности (ИИТ) при формировании ингибиторов в ряде случаев требуется постоянное увеличение количества вводимых доз или введение больших доз препаратов. Однако такой подход требует особого внимания, поскольку терапия, проводимая с целью ИИТ, может провоцировать развитие синдрома острой почечной недостаточности или анафилактических реакций. Предполагается, что часть нежелательных реакций, в частности при применении фактора IX, связана с его избыточной прокоагулянтной активностью.

В ряде научных сообщений обсуждаются вопросы, связанные с механизмами формирования ингибиторов при гемофилии, подходами к профилактике их развития, а также стратегиями формирования иммунной толерантности [14, 17, 18].

Исследования, касающиеся диагностики, терапии гемофилии и ее осложнений, перспективных разработок новых лекарственных препаратов, совершенствования технологии производства лекарственных препаратов, используемых для лечения пациентов с указанной патологией, продолжают. Подробная информация, отражающая указанные аспекты, приведена в ряде научных публикаций [19–23].

Основные принципы проведения клинических исследований препаратов фактора IX

Клинические исследования проводятся при разработке «новых» препаратов факторов свертывания крови. В ряде случаев они могут быть необходимы и при внесении изменений в процесс производства ранее зарегистрированных препаратов, используемых для лечения пациентов с гемофилией В. Вопрос о проведении клинических исследований решается на основе анализа результатов предварительно проведенных исследований по оценке качества и выполнения необходимого объема доклинических исследований. Вносимые изменения могут касаться внедрения новых способов очистки целевого белка, использования новых или дополнительных стадий инактивации и элиминации вирусов и др. Дизайн исследования препаратов, заявляемых для регистрации в качестве «новых» препаратов, отличается от дизайна исследования по доказательству сопоставимости препаратов, полученных до и после внесения изменений в процесс производства ранее зарегистрированного препарата. При проведении клинических исследований по оценке эффективности и безопасности принимают во внимание особенности препаратов, источник их получения (препараты на основе человеческих плазменных коагуляционных факторов или препараты, полученные по технологии рекомбинантных ДНК).

⁵ ICH Q5A (R1) Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. ICH; 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). EMEA; 1996.

Guideline on virus safety evaluation of biotechnological investigational medicinal products (EMA/CHMP/BWP/398498/2005). EMEA; 2008.

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

При разработке программы клинических исследований прежде всего должны быть учтены общие рекомендации, изложенные в руководствах по Надлежащей клинической практике (GCP)⁶. Вопросы, касающиеся проведения клинических исследований препаратов факторов свертывания крови, отражены в отечественных⁷ и международных документах⁸.

Следует отметить, что руководящие документы регулярно обновляются на основании накопленного опыта применения лекарственных препаратов, используемых для лечения гемофилии, и новых научных достижений в изучении указанной патологии. В данном обзоре представлены основные принципы проведения клинических исследований препаратов фактора IX, изложенные в обновленном документе Европейского агентства по лекарственным средствам (EMA)⁹.

В соответствии с рекомендациями базового документа EMA при регистрации «новых» препаратов фактора IX, как рекомбинантных, так и полученных из плазмы крови, прежде всего должны быть проведены клинические исследования по изучению фармакокинетики (ФК). Оценку проводят по следующим показателям: период полувыведения, площадь под кривой (AUC), клиренс и восстановление активности фактора свертывания.

При проведении фармакокинетических исследований рекомендуется использовать один и тот же метод при анализе образцов крови пациента и определении содержания фактора IX в препарате. Это связано с тем, что для определения фактора IX существует несколько методик, и в зависимости от используемого метода, реагентов и стандартных образцов значения оцениваемых показателей могут значительно отличаться и влиять на результаты мониторинга исследуемых образцов крови.

Для получения оптимальных результатов и снижения их вариабельности исследования желательнее проводить централизованно в одной лаборатории. Необходимо также учитывать следующие обстоятельства. Если препараты фактора IX, используемые при проведении клинических исследований, согласно маркировке имеют разную активность, т.е. содержат разное количество активного вещества, то после восстановления концентрация фактора IX может значительно различаться. В связи с этим следует исследовать ФК препарата с самой низкой и самой высокой концентрацией.

Далее оценивают эффективность и безопасность препарата с участием пациентов всех возрастных групп. Оценка эффективности лечения препаратом фактора IX складывается из оценки профилактической эффективности (при регулярном использовании препарата для профилактики спонтанных кровотечений), а также терапевтической эффективности (при использовании по требованию, например, для купирования уже развившегося кровотечения). Оценка проводится как са-

мым пациентом, так и лечащим врачом за период как минимум 50-дневного введения препарата (50 ДВ).

Во время проведения клинических исследований у всех пациентов, получающих препарат фактора IX, должны оцениваться параметры безопасности, включая оценку иммуногенности и других нежелательных реакций, а также влияния препарата на жизненно важные показатели¹⁰.

Для определения ингибиторов используют метод Бетезда (Bethesda) или его модификацию (метод Бетезда в модификации Неймегена (Nijmegen)). Титр ингибиторов указывают в единицах Бетезда (БЕ/ВУ) в 1 мл. За 1 единицу Бетезда принято считать такое количество АТ, которое блокирует 50% активности фактора в контрольном образце плазмы крови. Для вычисления активности ингибиторов плазму крови пациента последовательно разводят до концентрации, которая блокирует 50% или менее активности фактора в контрольной плазме крови. После этого, зная степень разведения плазмы крови пациента, определяют активность ингибитора. Диагноз ингибиторной гемофилии устанавливается при титре ингибитора $\geq 0,6$ БЕ.

Как правило, при низком титре (менее 5 БЕ) ингибиторы выявляются непостоянно. При титрах более 5 БЕ («высокоответчающие пациенты») присутствие ингибиторов носит постоянный характер. Наиболее часто ингибиторы формируются в первые 50 дней введения (ДВ) препаратов фактора свертывания крови и после интенсивной терапии при хирургическом вмешательстве.

При исследовании иммуногенности процедуру забора образцов крови для определения ингибиторов рекомендуется проводить не ранее, чем через 3 дня после введения лекарственного препарата, поскольку отмывочный период составляет 4 дня. Соблюдение указанных сроков позволяет исключить влияние на результаты определения ингибиторов остаточного содержания препарата в исследуемых образцах. При этом следует учитывать специфические свойства препарата, например увеличенный период полувыведения, что может потребовать изменения сроков процедуры забора образцов крови, т.е. взятие образцов в более поздние сроки.

При проведении клинических исследований у детей ингибиторы рекомендуют проверять каждые 5 дней при введении первых 20 ДВ, затем каждые 10 дней с 21 до 50 ДВ и далее не менее 2 раз в год до 150 ДВ. Пациенты, получившие более 150 ДВ, тестируются на наличие ингибиторов 1 раз в год и в зависимости от клинических показаний.

В случае выявления ингибиторов должна быть проанализирована полная информация о пациентах с оценкой частоты выявления специфических АТ, установления их влияния на клинические эффекты, т.е. определена клиническая значимость наличия ингибиторов, а также собраны сведения о терапевтических дозах и количестве дней приема препарата.

⁶ Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2019.

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

Guideline for good clinical practice E6(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996.

ICH Topic E 8 General considerations for clinical trials. Note for guidance on general considerations for clinical trials (CPMP/ICH/291/95). EMEA; 1998.

Guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical product. WHO Technical Report Series, No. 850, 1995, Annex 3.

Guideline on the clinical investigation of the pharmacokinetics of therapeutic proteins (CHMP/EWP/89249/2004). EMEA; 2007.

⁷ Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К.; 2013.

⁸ Guideline on clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor IX products (EMA/CHMP/BPWP/144552/2009). EMA; 2015.

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-clinical-investigation-recombinant-human-plasma-derived-factor-ix-products-revision_en.pdf

Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor IX products (EMA/CHMP/BPWP/144552/2009). EMA; 2011.

⁹ Guideline on clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor IX products (EMA/CHMP/BPWP/144552/2009). EMA; 2015.

¹⁰ Там же.

Риск развития тромбообразования, т.е. тромбогенность, также должна рассматриваться как потенциальная проблема безопасности. При исследованиях «новых» препаратов фактора IX для оценки возможного риска развития тромбоэмболических осложнений проводят определение маркеров активации коагуляции (фрагменты протромбина 1 + 2, комплексы тромбин–антитромбин (ТАТ) и D-димеров).

Образцы сыворотки крови пациентов, включенных в клиническое исследование, полученные до и в процессе лечения, должны храниться при температуре минус 70 °С для того, чтобы при необходимости провести их повторное тестирование.

Результаты исследований, проведенных до регистрации препарата, должны быть подтверждены в последующих пострегистрационных клинических исследованиях, а также должна быть получена дополнительная информация по эффективности и безопасности, включая сведения по иммуногенности препарата.

Исследования по доказательству сопоставимости препаратов, произведенных до и после внесения изменений в процессе производства, осуществляют поэтапно, начиная с исследований по оценке качества, которые при необходимости должны быть подтверждены результатами доклинических и/или клинических исследований. Объем клинических данных, которые должны быть предоставлены в регуляторный орган для утверждения внесенных изменений, определяется в каждом конкретном случае индивидуально и зависит от потенциального влияния на свойства препарата изменений, внесенных в процесс производства. Объем может варьировать от сравнительных фармакокинетических исследований препаратов, полученных до и после внесения изменений, до полного объема клинических исследований, требуемых для «нового» препарата.

Клинические исследования при регистрации препаратов фактора IX, заявляемых как «новые»

При разработке «новых» препаратов на основе рекомбинантного фактора IX проводятся клинические исследования с участием ранее леченных пациентов (РЛП) и ранее не леченных пациентов (РНП). Это могут быть препараты на основе новых генетических конструкций или препараты на основе модифицированной молекулы фактора IX. При этом модификация выполнена с целью изменения фармакологических эффектов, например за счет изменения параметров ФК (увеличение времени полувыведения) и др. Подобные исследования (с участием РЛП и РНП) также проводятся для препаратов фактора IX, изготовленных с использованием новых способов получения рекомбинантного белка, например новой линии клеток, имеющей ограниченный опыт применения.

Включение в предрегистрационные клинические исследования «нового» препарата не только РЛП препаратами фактора IX, но и РНП необходимо с целью адекватной оценки эффективности и безопасности препаратов для данной популяции пациентов. РНП считаются пациенты, которые никогда не получали лечение препаратами свертывания крови, однако они могли предварительно получать компоненты крови¹¹.

В случае плазменных препаратов фактора IX, например с использованием новых способов производства, необходимость в проведении клинических исследований с участием РНП рассматривается для каждого конкретного случая.

Поскольку гемофилия В относится к орфанным заболеваниям, в клинические исследования может быть включено

ограниченное число пациентов. Однако их количество должно быть оптимальным по соотношению получения необходимых клинических данных для оценки эффективности и безопасности препарата и наличия пациентов с редким заболеванием. Как правило, достаточным считается включение в клинические исследования как минимум 40 РЛП, что позволяет получить необходимую информацию об эффективности препарата (в плане восстановления достаточного уровня фактора IX для купирования развившегося кровотечения и предотвращения спонтанных), а также об общей безопасности препарата.

Важен поэтапный подход включения пациентов в клинические исследования относительно возраста и предварительного лечения препаратами фактора IX. Изначально в исследование включаются РЛП в возрасте 12 лет и старше. Дети от 0 до 12 лет могут быть включены в исследование после завершения изучения ФК, эффективности и безопасности препарата у 10 РЛП старшего возраста (12 лет и старше), которые получили не менее 50 ДВ. При этом следует предусмотреть последовательность включения детей в исследование — вначале дети от 6 до 12 лет, затем дети младше 6 лет. Исследования с участием детей в возрасте до 12 лет также должны начинаться с изучения ФК с последующим исследованием эффективности и безопасности не менее 50 ДВ у 20 пациентов в каждой из указанных возрастных подгрупп.

Для оценки индивидуального ответа пациента до первого введения «нового» препарата фактора IX должна быть доступна информация по ФК при предыдущем применении препарата фактора IX (исторические или недавно полученные данные как минимум по восстановлению активности и периоду полувыведения препарата).

Клинические исследования детской популяции с участием РНП следует начинать после того, как будут завершены и проанализированы результаты исследований 10 РЛП в возрасте до 12 лет, получивших по 50 ДВ. При этом как минимум 5 пациентов из указанных 10 должны быть в возрасте до 6 лет. К моменту регистрации «нового» препарата должны быть получены и проанализированы результаты оценки эффективности и безопасности по 20 РНП, получившим не менее 50 ДВ препарата¹².

При проведении клинических исследований должно использоваться не менее 3 серий препарата.

Основные положения, касающиеся принципов проведения клинических исследований «новых» препаратов фактора IX, отражены в таблице 1.

Оценка фармакокинетики и эффективности препаратов фактора IX при исследовании ранее леченных пациентов

Пациенты в возрасте 12 лет и старше

Оценка параметров фармакокинетики. Фармакокинетические исследования должны быть выполнены по крайней мере у 12 РЛП (более 150 ДВ) с гемофилией В (фактор IX $\leq 2\%$). Пациенты не должны получать инфузионно любой из препаратов фактора IX в течение как минимум 4 дней (отмывочный период). У них не должно быть проявлений иммунодефицита, т.е. они должны быть иммунокомпетентными. В случае ВИЧ-положительных пациентов содержание CD4-Лф должно составлять не менее 200 клеток/мкл, при этом уровень вирусной нагрузки должен быть менее 200 частиц/мкл или менее 400 000 копий/мл. У исследуемых пациентов не должно на-

¹¹ Там же.

¹² Там же.

блюждаться спонтанных кровотечений и должны отсутствовать ингибиторы¹³.

При изучении ФК препарат фактора IX вводят в дозе 50–75 МЕ/кг и оценивают следующие показатели: уровень восстановления активности фактора, период полувыведения *in vivo*, площадь под кривой (*AUC*) и клиренс. Показатель восстановления активности препарата определяется как пик, зафиксированный в первый час после инфузии, и выражается в МЕ/мл или МЕ/кг.

Для определения исходного уровня оцениваемых показателей образцы крови берут непосредственно перед введением препарата фактора IX, через 10–15, 30 мин и 1 ч. Указанное время соответствует интервалу после завершения инфузии. Дополнительные сроки процедуры забора образцов включают 3, 6, 9, 24, 48 и 50 ч после инфузии. Необходимо фиксировать временной интервал после инфузии до взятия образцов, который следует учитывать при анализе результатов. Взятие образцов через 72 ч не является обязательным, если пациенту была введена доза, не превышающая 75 МЕ/кг.

При исследовании препаратов, имеющих продолжительный период полувыведения, для более корректной оценки сроков восстановления активности фактора IX точки забора образцов могут быть изменены.

С целью получения более детальной информации по результатам клинических исследований проводят дополнительный анализ параметров ФК с учетом массы тела пациентов с распределением их по группам (с нормальным диапазоном массы тела, избыточной или недостаточной массой).

Участвующие в исследовании ФК пациенты должны продолжать и далее лечение препаратом в тех же дозах. Через 3–6 месяцев у них повторно определяют аналогичные параметры ФК, а также проводят исследования по определению ингибиторов¹⁴.

Оценка эффективности при хирургических вмешательствах. Оценка клинической эффективности препарата фактора IX должна проводиться как минимум у 20 РЛП в возрасте 12 лет и старше, получивших более 150 ДВ, с гемофилией В (фактор IX $\leq 2\%$). В период наблюдения должен быть оценен клинический ответ пациентов на воздействие не менее 50 ДВ. У тех пациентов, которые получали препарат, находясь на лечении в стационаре по поводу купирования обильных кровотечений, ответ, оцениваемый врачом, определяется как «отсутствие», «умеренный», «хороший» или «отличный». Кроме того, при проведении исследований по оценке эффективности врачом должен определяться ответ как минимум у 5 пациентов, у которых было по меньшей мере 10 хирургических вмешательств (включая обширные операции) с оценкой эффективности гемостаза, потери крови и потребностей в переливаниях крови.

Клиническую оценку эффективности препарата фактора IX в отношении длительной профилактики следует проводить у пациентов, которые получали лечение в течение 6 месяцев, регистрируя количество терапевтических процедур, частоту и интервалы между эпизодами кровоизлияний. При этом проводят учет количества инфузий и введенного препарата фактора IX, рассчитывая потребление препарата в МЕ/кг в месяц и в год. Также рассчитывают количество препарата (в МЕ/кг), которое потребовалось в случае его использования по каждо-

му из следующих показаний, — для профилактики или лечения (в последнем случае выделяют необходимость введения препарата для купирования кровотечения или при хирургическом вмешательстве)¹⁵.

Непрерывная инфузия. Оценка эффективности непрерывной инфузионной терапии должна проводиться по крайней мере у 10 пациентов с тяжелой формой гемофилии В (фактор IX $\leq 2\%$), которым в плановом порядке проводятся обширные хирургические операции.

Каждому пациенту перед операцией проводят фармакокинетический анализ для того, чтобы определить значение клиренса. По величине клиренса рассчитывают начальную скорость инфузии препарата, затем после первых 24 ч непрерывной инфузии ежедневно рассчитывают величину клиренса по формуле с использованием уровня устойчивого состояния и известной скорости инфузии.

Результатом клинического исследования является оценка эффективности и безопасности препарата во время операции и в течение как минимум 6 дней после операции с учетом потребления фактора IX, гемостатического ответа и кровопотери, потребности в переливании крови, а также местных и системных нежелательных реакций¹⁶.

Пациенты младше 12 лет

Дети младше 12 лет могут быть включены в клинические исследования только после оценки безопасности 50 ДВ препарата у 10 детей в возрасте от 12 лет и старше, участвующих в клиническом исследовании как РЛП. Исследования детей более младшего возраста важны, так как реакция на введение препарата у детей и взрослых может существенно отличаться.

В исследование включают не менее 20 детей, предварительно получавших лечение препаратами фактора IX (более 50 ДВ), которых разделяют на 2 возрастные когорты. Как минимум 10 пациентов должны быть в возрасте от 6 до 12 лет, и еще 10 — младше 6 лет.

Клинические исследования проводятся поэтапно и начинаются с оценки ФК параметров (показатель восстановления, период полувыведения *in vivo*, *AUC* и клиренс). Количество процедур забора образцов крови у детей может быть уменьшено, временные точки могут быть следующими: непосредственно перед введением препарата (базовый уровень), через 1, 10, 24 и 48 ч после инфузии препарата. Для препаратов фактора IX с длительным периодом полувыведения могут потребоваться дополнительные сроки процедуры забора образцов. Очень важно зафиксировать точное время процедуры забора образцов и учитывать его при анализе результатов. При проведении исследований дети должны получить как минимум 50 ДВ препарата, что соответствует рекомендациям для предрегистрационных клинических исследований¹⁷.

У всех пациентов должно проводиться тестирование на выявление ингибиторов. При их обнаружении должен осуществляться анализ с учетом частоты выявления, срока формирования ингибиторов (количества ДВ препарата) и их клинической значимости.

Как правило, результаты клинических исследований, проведенных до регистрации препаратов с участием небольшого числа пациентов, считаются недостаточными для оценки всех аспектов терапии препаратами фактора IX, что в особенности

¹³ Там же.

¹⁴ Там же.

¹⁵ Там же.

¹⁶ Там же.

¹⁷ Там же.

касается вопросов безопасности, связанных с иммуногенностью. В связи с этим для получения дополнительной информации и подтверждения результатов предрегистрационных исследований должны быть проведены клинические исследования после регистрации препарата.

План управления рисками

Для каждого конкретного препарата план управления рисками (ПУР) должен быть составлен с учетом результатов исследования, полученных в процессе предрегистрационных исследований, и с учетом общих рекомендаций по формированию ПУР, включая правила надлежащей практики фармаконадзора Евразийского экономического союза¹⁸. В ПУР должны быть отражены основные вопросы, касающиеся информации о препарате фактора IX, являющемся «новым» или препаратом, в процесс производства которого внесены значительные изменения, а также сведения, полученные при разработке препарата.

Ниже приведены вопросы, которые должны быть отражены в ПУР. Поскольку наиболее серьезным осложнением при гемофилии является образование ингибиторов, в сводный отчет, представляемый в уполномоченный орган, включаются сведения об ингибиторах, зарегистрированных *de novo* или транзиторных (определяемых периодически). Также представляется информация, отражающая следующие вопросы: источник сообщения об ингибиторах (отчеты клинических исследований, пострегистративный мониторинг, спонтанные сообщения и др.), титр ингибиторов (низкий или высокий), периодически выявляемые ингибиторы и др. Для окончательного заключения о наличии ингибиторов у пациента необходимо подтверждение путем повторного анализа второго отдельно взятого образца в центральной лаборатории.

Следует отметить, что риски образования ингибиторов фактора IX определяются следующими факторами: тяжесть гемофилии; терапевтический статус (РНП или РЛП); кумулятивное воздействие препаратов фактора IX (общее количество ДВ препарата и доза на одно введение); вид мутации гена, кодирующего синтез фактора IX; этническая принадлежность пациента; возраст пациента на момент начала терапии; интенсивность терапии и др.

Также выделяют риски для отдельных групп пациентов:

- пациенты, перенесшие хирургическое вмешательство, у которых впоследствии сформировались ингибиторы;
- пациенты, у которых была замена одного препарата на другой препарат фактора IX.

Данные по пациентам с заменой препарата должны быть проанализированы отдельно, так как указанные пациенты имеют высокий риск формирования ингибиторов, и у них возможно снижение или отсутствие клинического эффекта. Особенно это важно для препаратов в случае внесения значительных изменений в процесс их производства.

Следует учитывать, что на формирование ингибиторов могут указывать отсутствие клинического эффекта от лечения лекарственным препаратом и развитие кровотечений. Таким пациентам требуется проведение исследований по следующим показателям: восстановление активности фактора, определение периода полувыведения, подтверждение наличия ингибиторов и их характеристика.

Кроме того, важное значение имеет определение рисков развития ожидаемых нежелательных реакций. Известно, что

при применении препаратов фактора IX возможно развитие реакций гиперчувствительности и анафилактических реакций, которые следует классифицировать в соответствии с местными и системными реакциями. Реакции могут быть результатом формирования иммунного ответа как на действующее вещество препарата, вспомогательные вещества, так и на посторонние примеси, в том числе белки клеток-хозяина, реагенты, используемые в процессе производства и др. Пациенты, у которых развилась анафилактическая реакция, должны быть тщательно обследованы, включая контроль на наличие ингибиторов. В представляемый отчет включают сведения о статусе терапии (например, РНП или РЛП), данные о характеристике класса иммуноглобулинов АТ к фактору IX (IgE или IgG) и др.

Следует отметить, что большое значение при применении препаратов свертывания крови имеет тщательный контроль за развитием тромботических осложнений, сведения о которых сообщаются в уполномоченный орган и включаются в сводный отчет. Дополнением к ПУР является протокол пострегистративных исследований.

Пострегистративные исследования

После регистрации лекарственного препарата с целью получения дополнительной информации и подтверждения результатов проведенных исследований должны быть проведены пострегистративные клинические исследования. Особое внимание должно быть уделено вопросам безопасности, связанной с проявлениями иммуногенности, что сопровождается формированием специфических АТ к фактору IX, развитием побочных реакций (анафилактических и анафилактоидных), а также тромботическими осложнениями. При проведении данных исследований оценивается также общая безопасность и клиническая эффективность препарата.

При выборе пациентов предпочтительным является включение в исследование добровольцев, проживающих в тех регионах, в которых предполагается использование препарата. В исследование могут быть включены пациенты с тяжелой гемофилией после успешной терапии, проведенной с целью ИИТ. Результаты исследования указанных пациентов важны в отношении получения информации о безопасности и эффективности препарата для этой когорты пациентов. Доля таких пациентов не должна превышать 25% всей исследуемой популяции¹⁹.

В пострегистративное исследование требуется включение как минимум 50 пациентов. Для препаратов фактора IX, полученных из плазмы крови, изготовленных по известной технологии, в исследование может быть включено меньшее количество пациентов при предоставлении соответствующего обоснования.

В исследование включают РЛП, которые получили более 150 ДВ, независимо от их возраста. Последующее наблюдение за каждым пациентом должно продолжаться до получения не менее 100 ДВ. Как правило, все пациенты, которые участвовали в предрегистративных клинических исследованиях, могут быть включены в последующие пострегистративные исследования. Желательно сбалансированное распределение пациентов по возрасту. Пациенты, включенные в исследование, не должны иметь клинических проявлений, указывающих на наличие ингибиторов. Данные об отсутствии ингибиторов

¹⁸ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

¹⁹ Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. Haemophilia. 2013;19(1):e1–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x>

Таблица 1. Клинические исследования «новых» препаратов фактора IX²⁰
Table 1. Clinical trials with “new” factor IX products²⁰

Участники исследования Trial subjects	Исследуемые параметры Investigation	Оцениваемые показатели. Рекомендуемые условия Parameters. Recommended conditions
Предрегистрационные исследования с участием РЛП в возрасте 12 лет и старше Pre-authorisation studies in previously treated patients (PTPs) from the age of 12 and above		
12 пациентов (фактор IX ≤2%) без ингибиторов и без спонтанных кровотечений 12 patients (factor IX ≤2%) without inhibitors and without spontaneous bleeding	Фармакокинетика Pharmacokinetics	Восстановление активности фактора IX, период полувыведения, AUC, клиренс. Пациенты должны пройти повторное тестирование через 3–6 месяцев (включая анализ на ингибиторы фактора IX) Factor IX activity recovery, half-life, AUC, clearance. Patients should be re-tested after 3–6 months (including factor IX inhibitor assay)
	Безопасность Safety	Артериальное давление, частота сердечных сокращений, температура, частота дыхания. Побочные реакции. Тромбогенность Blood pressure, heart rate, temperature, respiratory rate. Adverse reactions. Thrombogenicity
5 пациентов (фактор IX ≤2%), перенесших по меньшей мере 10 хирургических вмешательств 5 patients (factor IX ≤2%) who underwent at least 10 surgical procedures	Клиническая эффективность Clinical efficacy	Эффективность гемостаза, кровопотеря и потребность в переливании. Потребление фактора IX Efficacy of haemostasis, loss of blood and requirement for transfusion. Factor IX consumption
	Безопасность Safety	Побочные реакции. Тромбогенность Adverse reactions. Thrombogenicity
Эффективность и безопасность у 20 пациентов (фактор IX ≤2% и CD4 >200 клеток/мкл) Efficacy and safety in 20 patients (factor IX ≤2% and CD4 >200 cells/μl)	Клиническая эффективность Clinical efficacy	Потребление фактора IX, оценка врачом ответа при лечении обильных кровотечений Factor IX consumption, physician's assessment of response in treatment of major bleedings
	Иммуногенность Immunogenicity	Титр ингибиторов в единицах Бетезда — непосредственно перед первым введением препарата, после 10–15 ДВ, 50–75 ДВ и в случае подозрений на образование ингибиторов. Продолжительность как минимум 50 ДВ Inhibitor titre in Bethesda Units immediately before first exposure, ED10–15, ED50–75 and if there is any suspicion of inhibitor development. Continue for a minimum of 50 exposure days
	Безопасность Safety	Побочные реакции. Тромбогенность Adverse reactions. Thrombogenicity
Предрегистрационные исследования с участием РЛП в возрасте младше 12 лет (исследования начинают после получения и анализа результатов исследования 10 РЛП в возрасте 12 лет и старше, получивших 50 ДВ) Pre-authorisation studies in previously treated patients (PTPs) under the age of 12 (to be started after results of 50 EDs in 10 PTPs ≥12 years have become available and have been analysed)		
10 пациентов (возраст от 6 до 12 лет, фактор IX ≤2%) без ингибиторов и без спонтанных кровотечений 10 patients (6–12 years, factor IX ≤2%) without inhibitors and without spontaneous bleeding 10 пациентов (более 50 ДВ, младше 6 лет, фактор IX ≤2%) без ингибиторов и без спонтанных кровотечений 10 patients (>50 EDs, <6 years, factor IX ≤2%) without inhibitors and without spontaneous bleeding	Фармакокинетика Pharmacokinetics	Восстановление активности фактора IX, период полувыведения, AUC, клиренс Factor IX activity recovery, half-life, AUC, clearance
	Безопасность Safety	Артериальное давление, частота сердечных сокращений, температура, частота дыхания. Побочные реакции. Тромбогенность Blood pressure, heart rate, temperature, respiratory rate. Adverse reactions. Thrombogenicity

²⁰ Guideline on clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor IX products (EMA/CHMP/BPWP/144552/2009). EMA; 2015.

Многоцентровое исследование с участием 20 детей, разделенных на 2 возрастные подгруппы, включающие 10 РЛП (от 6 до 12 лет) и 10 детей (младше 6 лет, получивших более 50 ДВ) Multicentre trial in 20 children allocated to 2 cohorts of 10 previously treated patients (6–<12 years) and 10 children (<6 years, >50 EDs)	Клиническая эффективность Clinical efficacy	Потребление фактора IX, оценка врачом ответа при лечении обильных кровотечений Factor IX consumption, physician's assessment of response in treatment of major bleedings
	Иммуногенность Immunogenicity	Тестирование на наличие ингибиторов непосредственно перед первым введением препарата, после 10–15 ДВ, 50–75 ДВ и в случае подозрения на образование ингибиторов. Продолжительность как минимум 50 ДВ Inhibitor testing immediately before first exposure, ED10–15, ED50–75 and if there is any suspicion of inhibitor development. Continue until a minimum of 50 exposure days
	Безопасность Safety	Побочные реакции. Тромбогенность Adverse reactions. Thrombogenicity
Пострегистрационные исследования Post-marketing investigation		
50 РЛП получают в общей сложности 100 ДВ (РЛП из предрегистрационного исследования могут продолжить участие в исследовании до получения 100 ДВ, «вновь включенные» РЛП должны получить 100 ДВ) 50 previously treated patients for 100 EDs in total (previously treated patients from pre-authorisation studies can be followed up to 100 EDs, “new” previously treated patients for 100 EDs)	Клиническая эффективность. Иммуногенность. Безопасность Clinical efficacy. Immunogenicity. Safety	Необходимо предоставить протокол в соответствии с указаниями, приведенными в тексте Protocol should be provided according to the requirements given in the text
Предрегистрационные исследования РНП (начинают после завершения и анализа результатов исследования 10 детей (как РЛП), получивших 50 ДВ (в возрасте от 0 до 12 лет, не менее 5 из которых должны быть младше 6 лет), и после завершения исследований фармакокинетики у детей в возрасте от 0 до 12 лет) Pre-authorisation studies in previously untreated patients (to be started after results of 50 EDs in 10 previously treated patients (of 0–12 years, at least 5 of which must be <6 years), have become available and have been analysed, and after completion of pharmacokinetic studies in children of 0–12 years)		
20 пациентов (наблюдение до получения не менее 50 ДВ) 20 patients (for at least 50 EDs)	Клиническая эффективность Clinical efficacy	Потребление фактора IX, оценка врачом ответа на лечение обильных кровотечений Factor IX consumption, physician's assessment of response in treatment of major bleedings
	Иммуногенность Immunogenicity	Тестирование на наличие ингибиторов — непосредственно перед первым введением препарата, после 10–15 ДВ, 50 ДВ и в случае подозрения на образование ингибиторов. Продолжительность как минимум 50 ДВ Inhibitor testing immediately before first exposure, ED10–15, ED50–75 and if there is any suspicion of inhibitor development. Continue until a minimum of 50 exposure days
	Безопасность Safety	Побочные реакции, артериальное давление, частота сердечных сокращений, температура. Тромбогенность Adverse reactions, blood pressure, heart rate, temperature. Thrombogenicity

Примечание. РЛП — ранее леченные пациенты; РНП — ранее не леченные пациенты; ДВ — дней введения препарата.
Note. ED—exposure day.

на момент включения в исследование должны быть подтверждены в центральной лаборатории.

В пострегистрационные исследования включают также РНП, часть которых участвовала в предрегистрационных исследованиях как РНП. При этом под наблюдением должны находиться по меньшей мере 20–40 РНП до получения 100 ДВ (из которых 20 РНП участвовали в предрегистрационных исследованиях).

Отчет о выполнении исследований должен быть представлен в регуляторный орган через 2 года после регистрации препарата, что дает возможность оценить правильность выбора пациентов, ход выполнения, результативность и соблюдение сроков проведения исследования. Пострегистрационные исследования должны быть завершены в течение 4 лет.

Заключение

Современные достижения в области биотехнологии обеспечивают разработку новых лекарственных препаратов для лечения гемофилии, кроме того, происходит совершенствование технологического процесса производства ранее зарегистрированных препаратов, что в ряде случаев требует проведения клинических исследований. Соблюдение основных принципов разработки программы клинических исследований и их проведения с учетом рекомендаций, изложенных в обновленном документе Европейского агентства по лекарственным средствам, позволяет адекватно оценивать как эффективность, так и безопасность лекарственных препаратов свертывания крови. Следует учитывать, что пациенты с гемофилией нуждаются в проведении постоянной заместительной терапии

препаратами факторов свертывания крови для предотвращения и купирования опасных для жизни кровоизлияний. Поскольку указанные препараты имеют белковую природу, их длительное применение провоцирует формирование специфических антител — ингибиторов, которые приводят либо к потере эффективности лекарственного препарата, либо к развитию побочных аллергических реакций. Данное положение необходимо учитывать при проведении клинических исследований.

Гармонизация требований проведения клинических исследований при разработке и обновлении отечественных документов на основании анализа опыта применения лекарственных препаратов, используемых для лечения гемофилии, и научных достижений в изучении указанной патологии будут способствовать внедрению в медицинскую практику современных препаратов для успешной терапии пациентов с гемофилией.

Вклад авторов. **Ж. И. Авдеева** — анализ и обобщение данных, изложенных в нормативных документах и научной литературе, написание, доработка текста; **А. А. Солдатов** — сбор, анализ и систематизация данных, изложенных в нормативных документах; **В. П. Бондарев** — окончательное утверждение версии рукописи для публикации; **В. А. Меркулов** — разработка дизайна обзорно-аналитического исследования.

Authors' contributions. **Zhanna I. Avdeeva**—analysis and consolidation of data from scientific and regulatory documents, writing, revising of the text; **Aleksandr I. Soldatov**—collection, analysis and systematisation of data from regulatory documents; **Vladimir P. Bondarev**—final approval of the version for publication; **Vadim A. Merkulov**—development of the analytical study design.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

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

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

Литература/References

1. Зозуля НИ, Свиринов ПВ. *Диагностика и лечение гемофилии. Национальные клинические рекомендации*. М.: Национальное гематологическое общество; 2014. [Zozulya NI, Svirin PV. *Diagnosis and treatment of hemophilia*. Moscow: Natsional'noe gematologicheskoe obshchestvo; 2014 (In Russ.)]
2. Волкова СА, Боровков НН. *Основы клинической гематологии*. Учебное пособие. Н. Новгород: НижГМА; 2013. [Volkova SA, Borovkov NN. *Clinical Hematology Basics*. Study guide. Nizhny Novgorod: NizhGMA; 2013 (In Russ.)]
3. Бломбек М, Антонович И, ред. *Нарушения свертывания крови. Практические рекомендации по диагностике и лечению*. М.: Медицинская литература; 2014. [Blombek M, Antonovich J, eds. *Blood coagulation disorders. Practical recommendations for diagnosis and treatment*. Moscow: Meditsinskaya literatura; 2014 (In Russ.)]
4. Сараева НО. *Гематология*. Учебное пособие. Изд. 2-е, перераб. Иркутск: ИГМУ; 2015. [Saraeva NO. *Hematology*. Study guide. 2nd ed. Irkutsk: IGMU; 2015 (In Russ.)]
5. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds. *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2001.
6. DeLoughery TG, ed. *Hemostasis and thrombosis*. 2nd ed. Georgetown, TX: Landes Bioscience; 2019. 23–31.
7. Баркаган ЗС, Момот АП. *Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза*. М.: Ньюдиамед; 2008. [Barkagan ZS, Momot AP. *Diagnosis and controlled therapy of hemostasis disorders*. Moscow: N'yudiamed; 2008 (In Russ.)]
8. Rogaeв EI, Grigorenko AP, Faskhutdinova G, Kittler EL, Moliaka YK. Genotype analysis identifies the cause of the «royal disease». *Science*. 2009;326(5954):817. <https://doi.org/10.1126/science.1180660>
9. Reitsma PH, Bertina RM, Ploos van Amstel JK, Riemens A, Briet E. The putative factor IX gene promoter in hemophilia B Leyden. *Blood*. 1988;72(3):1074–6.
10. Русанов ВМ, Левин И. *Лечебные препараты крови*. М.: Медпрактика-М; 2004. [Rusanov VM, Levin I. *Blood medicines*. Moscow: Medpraktika-M; 2004 (In Russ.)]
11. Зубкова НВ. Обеспечение инфекционной безопасности препаратов из плазмы крови доноров. *Гематология и трансфузиология*. 2014;59(2):44–9. [Zubkova NV. Infection safety of donor plasma preparations. *Gematologiya i transfuziologiya = Russian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2014;59(2):44–9 (In Russ.)]
12. Дереза ТЛ, Скрылева ИА, Кутурова ОГ, Берковский АЛ. Выделение плазменного фактора свертывания крови IX высокой степени очистки. *Гематология и трансфузиология*. 2014;59(2):25–9. [Dereza TL, Skryleva IA, Kutyurova OG, Berkovsky AL. Isolation of highly purified plasma factor IX. *Gematologiya i transfuziologiya = Russian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2014;59(2):25–9 (In Russ.)]
13. Velthove KJ, Over J, Abbink K, Janssen MP. Viral safety of human plasma-derived medicinal products: impact of regulation requirements. *Transfus Med Rev*. 2013;27(3):179–83. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2013.05.002>
14. DiMichele D. Inhibitor development in haemophilia B: an orphan disease in need of attention. *Br J Haematol*. 2007;138(3):305–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06657.x>
15. High KA. Factor IX: molecular structure, epitopes, and mutations associated with inhibitor formation. In: Aledort LM, Hoyer LW, Lusher JM, Reisner HM, White GC, eds. *Inhibitors to coagulation factors*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 386. Boston, MA: Springer; 1995. P. 79–86. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0331-2_6
16. Thorland EC, Drost JB, Lusher JM, Warrior I, Shapiro A, Koerper MA, et al. Anaphylactic response to factor IX replacement therapy in haemophilia B patients: complete gene deletions confer the highest risk. *Haemophilia*. 1999;5(2):101–5. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.1999.t01-1-00303.x>
17. Lillcrap D, Fijnvandraat K, Santagostino E. Inhibitors — genetic and environmental factors. *Haemophilia*. 2014;20(s4):87–93. <https://doi.org/10.1111/hae.12412>
18. DiMichele DM. Immune tolerance in haemophilia: the long journey to the fork in the road. *Br J Haematol*. 2012;159(2):123–34. <https://doi.org/10.1111/bjh.12028>
19. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2014;371(21):1994–2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407309>
20. Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *Lancet*. 2016;388(10040):187–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01123-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01123-X)

21. Nogami K, Shima M. Pathogenesis and treatment of hemophilia. In: Ishii E, eds. *Hematological disorders in children*. Singapore: Springer Nature; 2017. P. 189–204. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3886-0_9
22. Орлова НА, Ковнир СВ, Воробьев ИИ, Габиров АГ. Фактор свертывания крови IX для терапии гемофилии В. *Acta Naturae (русскоязычная версия)*. 2012;4(2):62–75. [Orlova NA, Kovnir SV, Vorobiev II, Gabibov AG. Coagulation factor IX for hemophilia B therapy. *Acta Naturae (Russian edition)*. 2012;4(2):62–75 (In Russ.)]
23. Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Мосягин ВД, Олефир ЮВ, Бондарев ВП. Основные направления по разработке и модификации препаратов для лечения гемофилии. *Гематология и трансфузиология*. 2016;61(4):208–15. [Soldatov AA, Avdeeva Zhl, Mosyagin VD, Olefir YuV, Bondarev VP. Main directions for the development and modification of preparations for the treatment of hemophilia. *Gematologiya i transfuziologiya = Russian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2016;61(4):208–15 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф. *Zhanna I. Avdeeva*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9377-1378>

Солдатов Александр Алексеевич, д-р мед. наук. *Aleksandr I. Soldatov*, Dr. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6624-2692>

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф. *Vladimir P. Bondarev*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. *Vadim A. Merkulov*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 12.09.2019

После доработки 06.02.2020

Принята к публикации 14.02.2020

Received 12 September 2019

Revised 6 February 2020

Accepted 14 February 2020

Интернализация рекомбинантной имиглуцеразы в перитонеальные макрофаги мыши и фибробласты мыши линии L929

И. В. Лягоскин*, М. С. Пантюшенко, О. М. Стрижакова, Н. К. Кудина, Е. Ю. Прудникова, П. В. Чичканова, С. Г. Аббасова

Общество с ограниченной ответственностью
«Международный биотехнологический центр «Генериум»
ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район,
Владимирская область, 601125, Российская Федерация

Фермент-заместительная терапия (ФЗТ) является одной из самых действенных при лечении болезней лизосомального накопления. Болезнь Гоше первого типа характеризуется недостатком нативного фермента β -глюкоцереброзидазы, который возмещают внутривенными инфузиями рекомбинантного фермента (имиглуцеразы). Клетками-мишенями имиглуцеразы являются макрофаги, в которые фермент проникает посредством взаимодействия с рецепторами маннозы на клеточной мембране. Оценка интернализации ферментов клетками-мишенями представляет интерес при разработке новых и воспроизведении существующих препаратов для ФЗТ. Для этих исследований широко применяются перитонеальные и альвеолярные макрофаги, макрофаги селезенки мелких лабораторных животных (крыс и мышей). Однако получение таких клеток затрагивает этические вопросы использования лабораторных животных. Альтернативой являются перевиваемые клеточные линии млекопитающих. **Цель работы:** провести сравнительные исследования интернализации рекомбинантной имиглуцеразы в перитонеальные макрофаги мыши и фибробласты мыши линии L929. **Материалы и методы:** Церезим®, серии 7HV0913, C6214H05, 7HV0888 (Джензайм Лтд., Великобритания); Глуразим, серии 020416, 011117, 021117 (ООО «МБЦ «Генериум», Россия). В работе использовали перитонеальные макрофаги, полученные от мышей линии BALB/c, и фибробласты мыши линии L929. Клетки культивировали в полной ростовой среде DMEM/Ф12 с добавлением 10% сыворотки плода крупного рогатого скота. Активность имиглуцеразы, проникшей в клетки, оценивали спектрофотометрически по гидролизу искусственного субстрата 4-метилумбеллиферил- β -D-глюкопиранозида. **Результаты:** представлены данные сравнительной оценки интернализации рекомбинантной имиглуцеразы, действующего вещества препаратов Церезим® и Глуразим, перитонеальными макрофагами мыши и клетками фибробластов мыши линии L929. Показано, что активность препаратов в лизатах перитонеальных макрофагов сопоставима с их активностью в лизатах клеток фибробластов мыши линии L929, при этом активность разработанного препарата Глуразим независимо от типа клеток была в границах допустимого диапазона (80–125%), установленного для биоподобных препаратов. **Выводы:** экспериментально доказано, что фибробласты мыши линии L929 могут быть рекомендованы для оценки интернализации рекомбинантной имиглуцеразы.

Ключевые слова: рекомбинантная имиглуцеразы; клетки-мишени; перитонеальные макрофаги; фибробласты мыши линии L929; интернализация

Для цитирования: Лягоскин ИВ, Пантюшенко МС, Стрижакова ОМ, Кудина НК, Прудникова ЕЮ, Чичканова ПВ, Аббасова СГ. Интернализация рекомбинантной имиглуцеразы в перитонеальные макрофаги мыши и фибробласты мыши линии L929. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(1):42–49. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-42-49>

Контактное лицо: Лягоскин Иван Владимирович; Lyagoskin@ibcgenerium.ru

Internalization of Recombinant Imiglucerase into Mouse Peritoneal Macrophages and L929 Mouse Fibroblasts

I. V. Lyagoskin*, M. S. Pantyushenko, O. M. Strizhakova, N. K. Kudina, E. Yu. Prudnikova, P. V. Chichkanova, S. G. Abbasova

International Biotechnology Center "GENERIUM",
14 Vladimirskaya St., Volginsky town, Petushinsky District,
Vladimir Oblast 601125, Russian Federation

Enzyme replacement therapy (ERT) is one of the most efficient treatments for lysosomal storage diseases. Type 1 Gaucher disease is caused by β -glucocerebrosidase enzyme deficiency, which may be compensated for by intravenous infusions of imiglucerase—a recombinant enzyme. Imiglucerase targets macrophages and enters these cells via interaction with mannose receptors on the cell membrane. Characterisation of internalization of enzymes by target cells is important in the context of the development of new medicines and production of existing ERT medicines. The peritoneal and alveolar macrophages, as well as macrophages of the spleen of small laboratory animals (rats and mice) are widely used in such studies. However, isolation of cells from animal sources raises ethical issues, and therefore continuous mammalian cell lines may offer an attractive alternative. **The aim of the**

study: to conduct comparative studies on the internalization of recombinant imiglucerase into mouse peritoneal macrophages and L929 mouse fibroblasts. **Materials and methods:** Cerezyme® batches 7HV0913, C6214H05, 7HV0888 (Genzyme Ltd., UK); Glurazim batches 020416, 011117, 021117 (LLC "IBC "Generium", Russia). We used peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice and L929 mouse fibroblasts. The cells were cultured in DMEM/F12 complete growth medium with 10% fetal bovine serum. The activity of imiglucerase internalized into the cells was evaluated spectrophotometrically by hydrolysis of the artificial substrate—4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside. **Results:** the study compared internalization of recombinant imiglucerase (the active ingredient of Cerezyme® and Glurazim) by mouse peritoneal macrophages and L929 mouse fibroblasts. It was demonstrated that the medicines activity in the lysates of peritoneal macrophages is comparable with that in the lysates of L929 mouse fibroblasts. Regardless of the model system, the activity of Glurazim stayed within the acceptable range (80–125%) established for biosimilar products. **Conclusions:** the experiments proved that L929 mouse fibroblasts could be recommended for assessment of internalization of recombinant imiglucerase.

Key words: recombinant imiglucerase; target cells; peritoneal macrophages; L929 mouse fibroblasts; internalization

For citation: Lyagoskin IV, Pantyushenko MS, Strizhakova OM, Kudina NK, Prudnikova EYu, Chichkanova PV, Abbasova SG. Internalization of recombinant imiglucerase into mouse peritoneal macrophages and L929 mouse fibroblasts. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(1):42–49. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-42-49>

Corresponding author: Ivan V. Lyagoskin; Lyagoskin@ibcgenerium.ru

Болезнь Гоше (БГ, глюкозилцерамидный липидоз, код по МКБ 10: E75.2 Другие сфинголипидозы) — наследственное заболевание, является одной из самых распространенных лизосомных болезней накопления [1]. БГ характеризуется недостаточностью ферментативной активности β -глюкоцереброзидазы, что приводит к избыточному накоплению глюкоцереброзида в тканевых макрофагах, которые носят название «клетки Гоше». Клетки Гоше обычно обнаруживаются в печени, селезенке, костном мозге и иногда также в легких, почках и кишечнике. Наиболее частые осложнения БГ — костно-суставные поражения, которые являются наиболее частой причиной инвалидности и смертности при данной болезни [2].

В 1970-х годах был предпринят ряд попыток лечения БГ внутривенным введением фермента (фермент-заместительная терапия, ФЗТ). Однако вводимый фермент обладал ограниченной терапевтической ценностью, поскольку вводимая немодифицированная β -глюкоцереброзидаза человека, полученная из плаценты, плохо проникала в клетки-мишени путем интернализации через маннозный рецептор из-за ограниченного количества концевых остатков маннозы [3, 4]. Маннозный рецептор (MP, CD206 или MRC1) является трансмембранным гликопротеином, который принадлежит к семейству лектинов С-типа. Данный рецептор экспрессирован у большинства тканевых макрофагов, дендритных клеток (ДК) и некоторых лимфатических или печеночных эндотелиальных клеток [1]. Его внеклеточная часть содержит N-терминальный богатый цистеином (CR) домен, который с высокой аффинностью связывает маннозу и фукозу. Маннозный рецептор участвует в выведении гликопротеинов из кровотока, включая сульфатированные гликопептидные гормоны и гликопротеины, высвобождающиеся в результате патологических процессов [5, 6].

Рекомбинантная имиглюцераза в отличие от нативного фермента (β -глюкоцереброзидаза) для усиления фармакологического действия дополнительно обрабатывается гликозидазами (нейраминидазой, β -N-ацетилглюкозаминидазой и β -галактозидазой), в результате чего структура ее боковых углеводных цепей заканчивается остатками маннозы, а это, в свою очередь, обеспечивает эффективную интернализацию белка в макрофаги, другие клетки, несущие рецепторы маннозы, и проявление специфической ферментативной активности в пораженных клетках-мишенях [7–9]. Таким образом, терапевтический эффект препаратов на основе фермента ре-

комбинантной имиглюцеразы обеспечивается как за счет его ферментативной активности, так и за счет эффективности проникновения в пораженные клетки-мишени. Поэтому при разработке биоподобных препаратов имиглюцеразы очень важно оценивать интернализацию разрабатываемых ферментов в сравнении с референтным.

Оценку активности рекомбинантной имиглюцеразы с точки зрения проникновения ее в клетки, экспрессирующие рецепторы маннозы (CD206), изучают как на перитонеальных макрофагах мыши, так и на культурах клеток. Применение клеточной линии позволит не только минимизировать использование лабораторных животных в экспериментах, но и получать более воспроизводимые результаты ввиду более стандартизируемых свойств клеточных линий.

Цель работы — провести сравнительные исследования интернализации рекомбинантной имиглюцеразы в перитонеальные макрофаги мыши и фибробласты мыши линии L929.

Материалы и методы

Исследуемые образцы. Церезим®, серии 7HV0913, C6214H05, 7HV0888 (Джензайм Лтд., Великобритания); Глуразим, серии 020416, 011117, 021117 (ООО «МБЦ «Генериум», Россия).

Клетки. Перитонеальные макрофаги получали от мышей линии BALB/c. Фибробласты мыши L929, линия NCTC clone 929 (L cell, L-929, derivative of Strain L (ATCC® CCL-1™)).

Получение перитонеальных макрофагов мыши. Перитонеальные макрофаги получали от мышей линии BALB/c возраста 7–8 недель (НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, Россия) путем промывания брюшной полости фосфатно-солевым буферным раствором, pH 7,2–7,6 (ФБР) («ЭКО-Сервис», Россия, кат. № В-60201). Содержание и уход за биологической тест-системой (мыши линии BALB/c) проводили в соответствии с нормами и правилами, указанными в «Политике работы с животными ООО «МБЦ «Генериум» и Руководстве по содержанию и использованию лабораторных животных¹. Исследование одобрено на заседании Комиссии по биоэтике ООО «МБЦ «Генериум».

Для снижения адгезии пробирку с суспензией перитонеальных клеток держали во льду. Клетки перитонеальной полости мыши осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 300 g. Осадок ресуспендировали в полной ростовой среде

¹ Белозерцева ИВ, Блинов ДВ, Красильщикова МС, ред. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Пер. с англ. Изд. 8-е. М.: ИРБИС; 2017.

DMEM/Ф12 (Sigma-Aldrich, США, кат. № D8900), содержащей 10% фетальной сыворотки плода крупного рогатого скота (HyClone®, США, кат. № SV30160.03), 1 мМ натрия пирувата (Lonza, Швейцария, кат. № BE13-115E), 1,2 г/л бикарбоната натрия (Sigma-Aldrich, США, кат. № S6297), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ООО НПП «ПанЭко», Россия, кат. № А063). После подсчета клеток с помощью прибора Nucleocounter (NucleoCounter® System (Chemometec, Дания)) готовили суспензию с концентрацией 5×10^5 клеток/мл.

Культивирование и получение клеточной суспензии фибробластов мыши линии L929. Фибробласты мыши линии L929 культивировали во флаконах в полной ростовой среде DMEM/Ф12. После достижения монослоя клетки с поверхности культурального флакона «снимали» обработкой раствором трипсин/ЭДТА (Lonza, Швейцария, кат. № BE02-007E), далее готовили суспензию клеток в ростовой среде. После подсчета клеток с помощью прибора Nucleocounter готовили суспензию с концентрацией 5×10^5 клеток/мл.

Приготовление лизатов клеток и оценка специфической активности интернализированной рекомбинантной имиглюцеразы. В 96-луночный микропланшет с V-образным дном (Corning Incorporated, США, кат. № 3894) вносили по 100 мкл суспензии клеток (5×10^4 клеток в лунку). Клетки осаждали и в лунки вносили по 50 мкл исследуемых препаратов в последовательных разведениях с шагом 1,2 в ростовой среде DMEM/Ф12 от 10 000 до 3349 нМ, все разведения вносили в трипликатах.

Для каждого препарата готовили дополнительные микропланшеты с клетками, которые обрабатывали ледяным глициновым буферным раствором состава (%): NaCl — 0,8, KCl — 0,038, MgCl₂ — 0,01, CaCl₂ — 0,01, глицин — 0,7, pH 3,0 [10].

Препараты с клетками инкубировали в CO₂-инкубаторе MCO-20AIC (Sanyo, Япония) при (37,0 ± 0,2) °C в течение 3 ч.

После инкубации клетки 5 раз промывали холодным ФБР (pH 7,2–7,6), осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл 1% раствора тритона X-100 (Applichem Panreac, США, кат. № 9002-93-1) и выдерживали в течение 30 мин при (37,0 ± 0,2) °C. Дополнительно клетки подвергали этапу лизиса путем трехкратной заморозки — разморозки суспензии. Уровень лизиса клеток контролировали микроскопией (микроскоп биомедицинский Nikon ECLIPSE Ti-s, Япония). Полученные лизаты осветляли центрифугированием при 350 g в течение 10 мин, супернатант (по 20 мкл) переносили в заранее подготовленные 96-луночные микропланшеты с плоским дном (Corning Incorporated, США, кат. № 3599) и добавляли субстрат — 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкопиранозид (Applichem Panreac, США, кат. № A1273,0500), который при взаимодействии с имиглюцеразой образовывал флуоресцирующий продукт — 4-метилумбеллиферон. В некоторых случаях приготовленные клеточные лизаты замораживали и хранили при минус 20 °C до проведения анализа.

Сигнал флуоресценции измеряли с помощью спектрофотометра SpectraMax® M3 (Molecular Devices, США) при длине волны возбуждения — 365 нм и длине волны эмиссии — 440 нм.

Активность интернализированного фермента оценивали как разницу значений интенсивности сигнала между необработанными и обработанными глициновым буферным раствором клетками в лунках.

Учет и обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Excel и GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Incorporated, США), аппроксимируя полученные дан-

ные 4-параметрической логистической функцией. Активность препаратов определяли по значению EC₅₀ (полумаксимальная эффективная концентрация, специфическая активность), которую рассчитывали в автоматическом режиме. Относительную специфическую активность (A₁, %) каждой серии препарата Глуразим рассчитывали по формуле (1):

$$A_1 = \frac{EC_{50}(\text{серия Церезим}^{\circledR} \text{ стандарт})}{EC_{50}(\text{серия Глуразим})} \cdot 100, \quad (1)$$

где EC₅₀ (серия Церезим® стандарт) — полумаксимальная эффективная концентрация (специфическая активность) серии препарата Церезим®, выбранного в качестве стандартного;

EC₅₀ (серия Глуразим) — полумаксимальная эффективная концентрация (специфическая активность) серии препарата Глуразим.

Относительную специфическую активность (A₂, %) каждой серии препарата Церезим® рассчитывали по формуле (2):

$$A_2 = \frac{EC_{50}(\text{серия Церезим}^{\circledR} \text{ стандарт})}{EC_{50}(\text{серия Церезим}^{\circledR})} \cdot 100, \quad (2)$$

где EC₅₀ (серия Церезим® стандарт) — полумаксимальная эффективная концентрация (специфическая активность) серии препарата Церезим®, выбранного в качестве стандартного;

EC₅₀ (серия Церезим®) — полумаксимальная эффективная концентрация (специфическая активность) серии препарата Церезим®.

Расчет для каждой серии препарата Глуразим проводили относительно каждой из серий референтного препарата (Церезим®), а расчет для серий референтного препарата — относительно серии референтного препарата, произвольно выбранной в качестве стандартного препарата.

Критериями приемлемости результатов теста были: 1) коэффициент вариации (% CV) для каждой тестируемой концентрации серии Церезим® и испытуемого препарата не должен был превышать 15%; 2) коэффициент аппроксимации (R²) 4-параметрической функции должен был быть не менее 0,95.

Оценка специфичности интернализации рекомбинантной имиглюцеразы. В отдельные лунки планшета с клетками вносили препарат в насыщающей концентрации 5000 нМ и раствор маннана (Sigma-Aldrich, США, кат. № M7504-250MG) в конечной концентрации 2,5 мг/мл для оценки специфичности интернализации белка через маннозный рецептор. Дальнейшие манипуляции проводили, как описано в подразделе Приготовление лизатов клеток и оценка специфической активности интернализированной рекомбинантной имиглюцеразы.

Статистическая обработка данных. Массив данных обрабатывали с применением программы GraphPad Prism 6.0 по рекомендациям, описанным в фармакопее США², а также используя непарный *t*-критерий Стьюдента³.

Для оценки биоподобия между двумя продуктами использовали интервал 80–125% для значений относительной специфической активности (relative potency) [11, 12].

Результаты и обсуждение

На первом этапе испытуемые препараты Глуразим и Церезим® были протестированы на способность проникать в перитонеальные макрофаги мыши, поскольку основными клетками-мишенями при БГ являются макрофаги. Результаты анализа интернализации рекомбинантной имиглюцеразы представлены в таблицах 1, 2.

² Chapter <1034> Analysis of Biological Assays. USP 35–NF 30; 2012.

³ GraphPad Prism User Guide.

Таблица 1. Показатели специфической активности (EC_{50}) для референтного препарата Церезим® после интернализации в клетки перитонеальных макрофагов, полученных от мышей линии BALB/c

Table 1. Specific activity (EC_{50}) of the reference product Cerezyme® after internalization in the cells of peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice

Серия препарата Церезим® Cerezyme® batch	EC_{50} , нМ EC_{50} , nM		
	Повторность Replicates		Среднее значение ± стандартное отклонение Mean ± standard deviation
	1	2	
7HV0913	8539	8606	8573 ± 47
C6214H05	10879	8178	9529 ± 1910
7HV0888	8056	8096	8076 ± 28
			8726 ± 1080

Таблица 2. Показатели специфической активности (EC_{50}) для препарата Глуразим после интернализации в клетки перитонеальных макрофагов, полученных от мышей линии BALB/c

Table 2. Specific activity (EC_{50}) of Glurazim after internalization in the cells of peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice

Серия препарата Глуразим Glurazim batch	EC_{50} , нМ EC_{50} , nM			
	Повторность Replicates			Среднее значение ± стандартное отклонение Mean ± standard deviation
	1	2	3	
020416	9447	10 630	8270	9449 ± 1180
011117	8654	11 417	9151	9741 ± 1473
021117	8655	8954	8961	8857 ± 175
				9349 ± 1025

Таблица 3. Показатели относительной специфической активности серий препаратов Церезим® и Глуразим после интернализации в клетки перитонеальных макрофагов, полученных от мышей линии BALB/c

Table 3. Relative potencies of Cerezyme® and Glurazim batches after internalization in the cells of peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice

Серия препарата Глуразим Glurazim batch	Относительная специфическая активность, % Relative potency, %			Среднее значение ± стандартное отклонение Mean ± standard deviation
	Серия препарата Церезим® Cerezyme® batches			
	7HV0913*	C6214H05*	7HV0888*	
020416	90	102	97	96,3 ± 6,0
011117	98	95	88	93,7 ± 5,1
021117	99	121	90	103,3 ± 15,9

* Специфическая активность серии препарата, используемая как референтная в данном исследовании, принята за 100%.

* The specific activity of the product batch used as the reference in this study is taken as 100%.

Таблица 4. Показатели относительной специфической активности для референтного препарата Церезим® после интернализации в клетки перитонеальных макрофагов, полученных от мышей линии BALB/c

Table 4. Relative potency of the reference product Cerezyme® after internalization into cells of peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice

Серия препарата Церезим® Cerezyme® batch	Относительная специфическая активность, % Relative potency, %			Среднее значение ± стандартное отклонение Mean ± standard deviation
	Серия препарата Церезим® Cerezyme® batches			
	7HV0913*	C6214H05*	7HV0888*	
7HV0913	100	95	94	96,3 ± 3,2
C6214H05	90	100	99	96,3 ± 5,5
7HV0888	98	101	100	99,7 ± 1,5

* Специфическая активность серии препарата, используемая как референтная в данном исследовании, принята за 100%.

* The specific activity of the product batch used as the reference in this study is taken as 100%.

Специфическая активность изучаемых препаратов в лизатах макрофагов была сопоставима. Среднее значение EC_{50} для серий референтного препарата Церезим® составило 8726 ± 1080 нМ, для серий препарата Глуразим — 9349 ± 1025 нМ. С помощью непарного t -критерия Стьюдента значимых различий не выявлено ($p = 0,2789$), что свидетельствует о сопоставимой эффективности их проникновения в клетки (рис. 1).

Относительная специфическая активность трех серий препарата Глуразим, вычисленная относительно каждой из серий Церезима®, укладывалась в диапазон 80–125% и варьировала

от 93,7 до 103,3%. Относительная специфическая активность серий референтного препарата Церезим®, рассчитанная относительно произвольно назначенной серии Церезим® в качестве стандарта, варьировала от 96,3 до 99,7%. Данные представлены в таблицах 3, 4.

Известно, что интернализация фермента имиглюцеразы может быть снижена при добавлении маннана в культуральную среду, который конкурирует с препаратом за связывание с маннозными рецепторами [10]. Для подтверждения биоподобия референтного и разработанного препаратов

необходимо было показать, что интернализация изучаемых препаратов в одинаковой степени снижается в присутствии маннана.

При внесении препаратов Глуразим и Церезим® в насыщающую концентрацию 5000 нМ в ростовую среду, содержащую маннан в концентрации 2,5 мг/мл, уровень интернализованного рекомбинантного фермента как для Глуразима, так и для Церезима® снижался в среднем на 25% (рис. 2).

Таким образом, добавление маннана в культуральную среду к культуре перитонеальных макрофагов мыши в одинаковой степени снижает интернализацию препаратов Глуразим и Церезим®, что доказывает сходный механизм их проникновения.

В исследованиях интернализации многими авторами применяются различные клеточные линии, несущие на своей поверхности маннозные рецепторы (CD206), например клетки линии U937 (гистиоцитарная лимфома человека), NR8383 (альвеолярные макрофаги крысы) [10, 13, 14]. В представленной работе была испытана клеточная линия фибробластов мыши L929.

Результаты анализа интернализации рекомбинантной имиглоуцеразы в клетки фибробластов мыши линии L929 представлены в таблицах 5, 6.

Относительная специфическая активность трех серий препарата Глуразим, вычисленная относительно каждой из серий Церезима®, варьировала от 101 до 112%, при этом укладывалась в диапазон 80–125%. Относительная специфическая активность серий референтного препарата Церезим® варьировала от 95,7 до 103,7% (табл. 7, 8). Полученные данные эффективности проникновения препаратов в клетки фибробластов мыши линии L929 хорошо согласуются с данными, полученными в экспериментах с перитонеальными макрофагами мышей как для средних значений EC_{50} , так и для показателей относительной специфической активности.

Как видно из данных, представленных в таблицах 5 и 6, значения специфической ферментативной активности сравниваемых препаратов в лизатах клеток фибробластов мыши линии L929 были сопоставимы — 8049 ± 424 нМ для референтного препарата Церезим® и 7179 ± 476 нМ для препарата

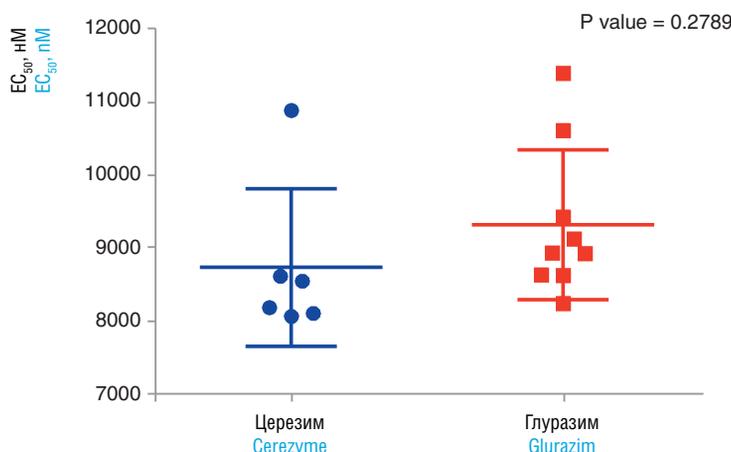


Рис. 1. Значения специфической активности для серий препаратов Церезим® и Глуразим после интернализации в клетки перитонеальных макрофагов мышей линии BALB/c и оценка значимости различий между препаратами по непарному *t*-критерию Стьюдента.

Fig. 1. Specific activities of Cerezyme® and Glurazim batches after internalization into the cells of peritoneal macrophages from BALB/c mice, and evaluation of the significance of the differences between the products using the unpaired Student's *t*-test.

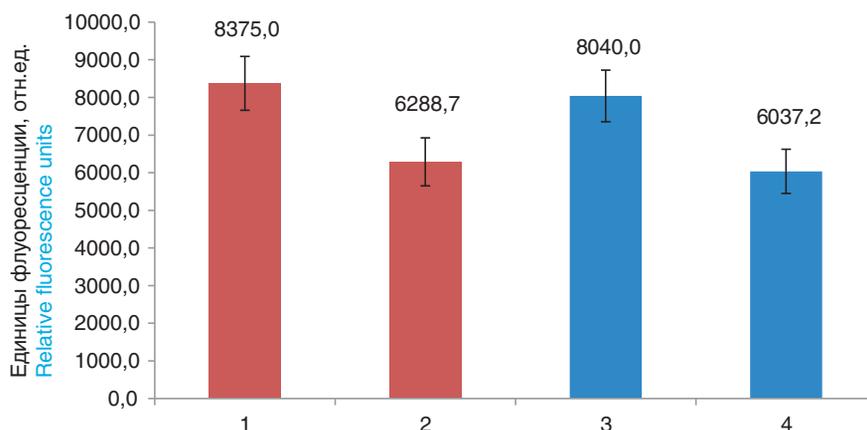


Рис. 2. Значения флуоресценции в лизатах клеток перитонеальных макрофагов мыши BALB/c после инкубации клеток с препаратами Глуразим и Церезим® в присутствии и отсутствии маннана. (1) Глуразим без маннана; (2) Глуразим с маннаном (2,5 мг/мл); (3) Церезим без маннана; (4) Церезим с маннаном (2,5 мг/мл).

Fig. 2. Fluorescence in the lysates of peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice after incubation of the cells with Glurazim and Cerezyme® with or without mannan. (1) Glurazim without mannan; (2) Glurazim with mannan (2.5 mg/mL); (3) Cerezyme without mannan; (4) Cerezyme with mannan (2.5 mg/mL).

Таблица 5. Показатели специфической активности (EC_{50}) для референтного препарата Церезим® после интернализации в клетки фибробластов мыши линии L929

Table 5. Specific activity (EC_{50}) of the reference product Cerezyme® after internalization into L929 mouse fibroblasts

Серия препарата Церезим® Cerezyme® batch	EC_{50} , нМ EC_{50} , nM		
	Повторность Replicates		Среднее значение ± стандартное отклонение Mean ± standard deviation
	1	2	
7HV0913	7497	8061	7779 ± 399
C6214H05	7847	8273	8060 ± 301
7HV0888	7880	8737	8309 ± 606
			8049 ± 424

Таблица 6. Показатели специфической активности (EC_{50}) для препарата Глуразим после интернализации в клетки фибробластов мыши линии L929

Table 6. Specific activity (EC_{50}) of Glurazim after internalization into L929 mouse fibroblasts

Серия препарата Глуразим Glurazim batch	EC_{50} , нМ EC_{50} , nM			
	Повторность Replicates			Среднее значение ± стандартное отклонение Mean ± standard deviation
	1	2	3	
020416	7199	8036	7880	7705 ± 445
011117	7102	6855	6800	6719 ± 161
021117	7195	6797	6751	6914 ± 244
				7179 ± 476

Таблица 7. Показатели относительной специфической активности серий препаратов Церезим® и Глуразим после интернализации в клетки фибробластов мыши линии L929

Table 7. Relative potencies of Cerezyme® and Glurazim batches after internalization into L929 mouse fibroblasts

Серия препарата Глуразим Glurazim batch	Относительная специфическая активность, % Relative potency, %			Среднее значение ± стандартное отклонение Mean ± standard deviation
	Серия препарата Церезим® Cerezyme® batches			
	7HV0913*	C6214H05*	7HV0888*	
020416	104	98	102	101,0 ± 3,1
011117	106	114	116	112,0 ± 5,3
021117	104	115	117	112,0 ± 7,0

* Специфическая активность серии препарата, используемая как референтная в данном исследовании, принята за 100%.

* The specific activity of the product batch used as the reference in this study is taken as 100%.

Таблица 8. Показатели относительной специфической активности для референтного препарата Церезим® после интернализации в клетки фибробластов мыши линии L929

Table 8. Relative potency of the reference product Cerezyme® after internalization into L929 mouse fibroblasts

Серия препарата Церезим® Cerezyme® batch	Относительная специфическая активность, % Relative potency, %			Среднее значение ± стандартное отклонение Mean ± standard deviation
	Серия препарата Церезим® Cerezyme® batches			
	7HV0913*	C6214H05*	7HV0888*	
7HV0913	100	103	108	103,7 ± 4,0
C6214H05	97	100	106	101,0 ± 4,6
7HV0888	92	95	100	95,7 ± 4,0

* Специфическая активность серии препарата, используемая как референтная в данном исследовании, принята за 100%.

* The specific activity of the product batch used as the reference in this study is taken as 100%.

Глуразим. С помощью непарного *t*-критерия Стьюдента выявлены статистически значимые различия ($p = 0,0031$), не превышающие 12% (рис. 3).

Оценивали влияние маннана на интернализацию рекомбинантного фермента в клетки фибробластов мыши линии L929. Установлено, что при концентрации препаратов Глуразим и Церезим® 5000 нМ и маннана в ростовой среде 2,5 мг/мл интернализация фермента снижалась в среднем на 51% (рис. 4). Результаты согласуются с данными, полученными при применении перитонеальных макрофагов, и подтверждают механизм проникновения фермента через маннозный рецептор.

Ранее нами было показано, что клеточная линия L929 экспрессирует и маннозо-6-фосфатный рецептор (M6P) (дан-

ные не представлены). Однако добавление натриевой соли D-маннозы-6-фосфата к культуральной среде не влияло на интернализацию рекомбинантной имиглюцеразы, что подтверждает механизм интернализации через маннозный рецептор и согласуется с результатами, полученными В. Brumshstein с соавт. [8].

Закключение

Проведенное исследование подтвердило биоподобие препарата Глуразим в отношении референтного препарата Церезим® на двух типах клеток. При использовании перитонеальных макрофагов мыши значения специфической активности составили по трем сериям для препарата Церезим® 8726 ±

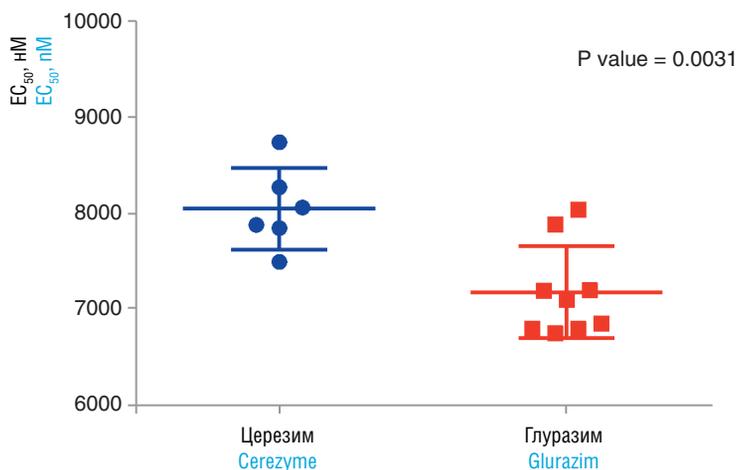


Рис. 3. Значения специфической активности для серий препаратов Церезим® и Глуразим после интернализации в клетки фибробластов мыши линии L929 и оценка значимости различий между препаратами по непарному *t*-критерию Стьюдента.
Fig. 3. Specific activities of Cerezyme® and Glurazim batches after internalization into L929 mouse fibroblasts, and evaluation of the significance of the differences between the products using the unpaired Student's *t*-test.

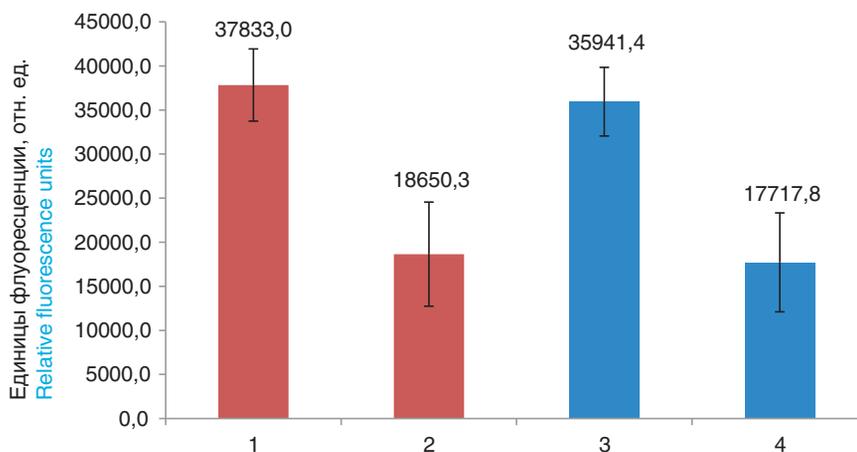


Рис. 4. Значения флуоресценции в лизатах клеток фибробластов мыши линии L929 после инкубации клеток с препаратами Глуразим и Церезим® в присутствии и отсутствии маннана. (1) Глуразим без маннана; (2) Глуразим с маннаном (2,5 мг/мл); (3) Церезим без маннана; (4) Церезим с маннаном (2,5 мг/мл).
Fig. 4. Fluorescence in the lysates of L929 mouse fibroblasts after incubation of the cells with Glurazim and Cerezyme® with or without mannan. (1) Glurazim without mannan; (2) Glurazim with mannan (2.5 mg/mL); (3) Cerezyme without mannan; (4) Cerezyme with mannan (2.5 mg/mL).

1080 нМ и для препарата Глуразим 9349 ± 1025 нМ, а при применении фибробластов мыши линии L929 — 8049 ± 424 и 7179 ± 476 нМ соответственно.

Значения специфической активности для препарата Глуразим не выходят за пределы допустимого диапазона (80–125%).

Экспериментально показано, что имиглюцераза проникает в перитонеальные макрофаги мыши и в клетки фибробластов мыши линии L929 по сходному механизму — путем взаимодействия с маннозным рецептором (CD206) и ее последующей интернализацией, а эффективность этого процесса, определенная по абсолютным значениям ферментативной активности в лизатах клеток, также сопоставима, что позволяет рекомендовать фибробласты мыши линии L929 для изучения CD206-опосредованной интернализации молекул. Применение клеточной линии позволит не только минимизировать использование лабораторных животных в экспериментах, но и получать более воспроизводимые результаты ввиду более стандартизируемых свойств клеточных линий.

Вклад авторов. *И. В. Лягоскин* — идея, планирование исследования, выполнение отдельных этапов экспериментальных работ с культурой перитонеальных макрофагов и фибробластами мыши линии L929, интерпретация результатов исследования, написание, доработка текста; *М. С. Пантюшенко* — выполнение отдельных этапов экспериментальных работ по оценке ферментативной активности интернализованного фермента, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; *О. М. Стрижакова* — выполнение отдельных этапов экспериментальных работ по получению лизатов клеток; *Н. К. Кудина* — выполнение отдельных этапов экспериментальных работ по наработке фибробластов мыши линии L929; *Е. Ю. Прудникова* — выполнение работ по статистической обработке данных, формализация списка литературы, работа с графическим материалом; *П. В. Чичканова* — выполнение отдельных этапов экспериментальных работ с биологической тест-системой, получение перитонеальных макрофагов; *С. Г. Аббасова* — сбор и систематизация данных, доработка текста.

Authors' contributions. *Ivan V. Lyagoskin*—research idea and planning, implementation of individual stages of experimental

work with the peritoneal macrophage culture and L929 mouse fibroblasts, interpretation of research results, writing, revising the text; **Marina S. Pantyushenko**—implementation of certain stages of experimental work involving the assessment of the enzymatic activity of the internalized enzyme, the final approval of the manuscript version for publication; **Olga M. Strizhakova**—implementation of individual stages of experimental work, namely obtaining cell lysates; **Natalya K. Kudina**—implementation of individual stages of experimental work, namely production of L929 mouse fibroblasts; **Elena Yu. Prudnikova**—statistical data processing, compilation of the list of references, preparation of graphic material; **Polina V. Chichkanova**—implementation of individual stages of experimental work with the biological test system, obtaining peritoneal macrophages; **Svetlana G. Abbasova**—data collection and systematisation, revising the text.

Благодарности. Авторы выражают благодарность руководству ООО «МБЦ «Генериум» в лице генерального директора Р. А. Хамитова.

Acknowledgements. The authors are grateful to the management of LLC “IBC “Generium” and the General Director R. A. Khamitov, in particular.

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

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

Литература/References

1. Zimran A. How I treat Gaucher disease. *Blood*. 2011;118(6):1463–71. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-308890>
2. Dekker N, van Dussen L, Hollak CE, Overkleeft H, Scheij S, Ghauharali K, et al. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood*. 2011;118(16):118–27. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-352971>
3. Sato Y, Beutler E. Binding, internalization, and degradation of mannose-terminated glucocerebrosidase by macrophages. *J Clin Invest*. 1993;91(5):1909–17. <https://doi.org/10.1172/JCI116409>
4. Friedman B, Vaddi K, Preston C, Mahon E, Cataldo JR, McPherson JM. A comparison of the pharmacological properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived beta-glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy in treatment of Gaucher disease. *Blood*. 1999;93(9):2807–16.
5. Novo JB, Morganti L, Moro AM, Paes Leme AF, Serrano SM, Raw I, Ho PL. Generation of a Chinese hamster ovary cell line producing recombinant human glucocerebrosidase. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:875383. <http://doi.org/10.1155/2012/875383>
6. Zhu Y, Li X, Schuchman EH, Desnick RJ, Cheng SH. Dexamethasone-mediated up-regulation of the mannose receptor improves the delivery of recombinant glucocerebrosidase to Gaucher macrophages. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308(2):705–11. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.060236>
7. Simmons BM, Stahl PD, Russell JH. Mannose receptor-mediated uptake of ricin toxin and ricin A chain by macrophages. Multiple intracellular pathways for a chain translocation. *J Biol Chem*. 1986;261(17):7912–20.
8. Brumshtein B, Salinas P, Peterson B, Chan V, Silman I, Sussman JL, et al. Characterization of gene-activated human acid- β -glucosidase: crystal structure, glycan composition, and internalization into macrophages. *Glycobiology*. 2010;20(1):24–32. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp138>
9. Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, Baum G, Brill-Almon E, Galili G, et al. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J*. 2007;5(5):579–90. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00263.x>
10. Tekoah Y, Tzaban S, Kizhner T, Hainrichson M, Gantman A, Golemb M, et al. Glycosylation and functionality of recombinant β -glucocerebrosidase from various production systems. *Biosci Rep*. 2013;33(5):e00071. <https://doi.org/10.1042/BSR20130081>
11. Carballo-Uicab G, Linares-Trejo JE, Mellado-Sánchez G, López-Morales CA, Velasco-Velázquez M, Pavón L, et al. Validation of a cell proliferation assay to assess the potency of a dialyzable leukocyte extract intended for batch release. *Molecules*. 2019;24(19):E3426. <https://doi.org/10.3390/molecules24193426>
12. Mejía-Calvo I, Muñoz-García L, Jiménez-Urbe A, Camacho-Sandoval R, González-González E, Mellado-Sánchez G, et al. Validation of a cell-based colorimetric reporter gene assay for the evaluation of Type I Interferons. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2019;22:e00331. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00331>
13. Azad AK, Rajaram MVS, Schlesinger LS. Exploitation of the macrophage mannose receptor (CD206) in infectious disease diagnostics and therapeutics. *J Cytol Mol Biol*. 2014;10(1):1000003. <https://doi.org/10.13188/2325-4653.1000003>
14. Van Patten SM, Hughes H, Huff MR, Piepenhagen PA, Waire J, Qiu H, et al. Effect of mannose chain length on targeting of glucocerebrosidase for enzyme replacement therapy of Gaucher disease. *Glycobiology*. 2007;17(5):467–78. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm008>

Об авторах / Authors

Лягоскин Иван Владимирович, канд. биол. наук. *Ivan V. Lyagoskin*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9058-1106>

Пантюшенко Марина Семеновна, канд. биол. наук. *Marina S. Pantyushenko*, Cand. Sci. (Biol.)

Стрижакова Ольга Михайловна, канд. вет. наук. *Olga M. Strizhakova*, Cand. Sci. (Vet.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0023-0028>

Кудина Наталья Константиновна. *Natalya K. Kudina*

Прудникова Елена Юрьевна, канд. вет. наук. *Elena Yu. Prudnikova*, Cand. Sci. (Vet.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7983-5312>

Чичканова Полина Владимировна. *Polina V. Chichkanova*

Аббасова Светлана Георгиевна, д-р биол. наук. *Svetlana G. Abbasova*, Dr. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5841-7587>

Поступила 04.12.2019

После доработки 27.01.2020

Принята к публикации 14.02.2020

Received 4 December 2019

Revised 27 January 2020

Accepted 14 February 2020

Свойства гетерологичного иммуноглобулина против лихорадки Эбола после длительного хранения

С. А. Мельников¹, И. В. Борисевич², Е. В. Рождественский¹, В. Б. Пантюхов¹, Н. К. Черникова¹, Е. В. Гордеев¹, С. А. Нимирская¹, А. Л. Хмелев¹, С. И. Сыромятникова¹, И. В. Шатохина¹, Т. М. Плеханова¹, Г. Д. Тиманькова¹, С. В. Борисевич^{1,*}, Д. А. Кутаев¹, Л. Ф. Стомба¹, Е. Ю. Мишалова¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, ул. Октябрьская, д. 11, Сергиев Посад-6, Московская область, 141306, Российская Федерация

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Погодинская, д. 10, стр. 1, Москва, 119121, Российская Федерация

Вспышка геморрагической лихорадки Эбола в восточных районах Демократической Республики Конго в 2018–2020 гг. показала сохраняющуюся высокую опасность вируса для человечества, а вспышка в Западной Африке в 2014–2016 гг., самая крупная с момента обнаружения вируса, — возможность его ввоза в другие страны, в том числе в Россию. В ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России в 1993 г. разработан специфический лошадиный иммуноглобулин для экстренной профилактики лихорадки Эбола в группах риска. Изучение и совершенствование его защитных свойств является актуальным направлением разработки средств биологической защиты. **Цель работы:** оценить свойства иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей после длительного хранения при температуре от 2 до 8 °С. **Материалы и методы:** серии гетерологичного иммуноглобулина против лихорадки Эбола, хранившиеся от 17 до 22 лет. Свойства иммуноглобулина оценивали согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV изд.). Специфическую активность препарата определяли в реакции нейтрализации с вирусом Эбола в культуре клеток почки африканской зеленой мартышки (GMK-AN-1(Д)) методом подавления образования негативных колоний (бляшкообразования). Определение молекулярных параметров иммуноглобулина проводили методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии согласно методикам, представленным в Европейской фармакопее 9.6 и ГФ РФ XIV изд. **Результаты:** хранение препарата иммуноглобулина против лихорадки Эбола в течение 17–22 лет при температуре от 2 до 8 °С привело к снижению уровня вируснейтрализующих антител к вирусу Эбола в 4 раза, уменьшению доли мономеров с 98 до 74–90%, увеличению доли димеров и полимеров, а также появлению фрагментов молекул иммуноглобулина. В одной из трех серий препарата была выявлена токсичность для белых нелинейных мышей. **Выводы:** полученные результаты свидетельствуют о целесообразности проведения дальнейших исследований по определению показателей качества серий иммуноглобулина против лихорадки Эбола, хранившихся менее продолжительные сроки, с целью оценки стабильности их исходных характеристик.

Ключевые слова: иммуноглобулин против лихорадки Эбола; геморрагическая лихорадка Эбола; срок годности; специфическая активность; молекулярные параметры

Для цитирования: Мельников СА, Борисевич ИВ, Рождественский ЕВ, Пантюхов ВБ, Черникова НК, Гордеев ЕВ, Нимирская СА, Хмелев АЛ, Сыромятникова СИ, Шатохина ИВ, Плеханова ТМ, Тиманькова ГД, Борисевич СВ, Кутаев ДА, Стомба ЛФ, Мишалова ЕЮ. Свойства гетерологичного иммуноглобулина против лихорадки Эбола после длительного хранения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(1):50–59. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-50-59>

Контактное лицо: Борисевич Сергей Владимирович; 48cnii@mil.ru

Properties of Heterologous anti-Ebola Immunoglobulin after Long Storage

S. A. Melnikov¹, I. V. Borisevich², E. V. Rozhdestvensky¹, V. B. Pantyukhov¹, N. K. Chernikova¹, E. V. Gordeev¹, S. A. Nimirskaya¹, A. L. Khmelev¹, S. I. Syromyatnikova¹, I. V. Shatokhina¹, T. M. Plekhanova¹, G. D. Timankova¹, S. V. Borisevich^{1,*}, D. A. Kutaev¹, L. F. Stovba¹, E. Yu. Mishalova¹

¹48 Central Scientific Research Institute, 11 Oktyabr'skaya St., Sergiev Posad-6, Moscow Region 141306, Russian Federation

²Centre for Strategic Planning and Biomedical Health Risk Management, 10/1 Pogodinskaya St., Moscow 119121, Russian Federation

Ebola outbreak in eastern parts of the Democratic Republic of the Congo in 2018–2020 proved that the virus remains highly hazardous for humans, and the outbreak in West Africa in 2014–2016, which was the largest Ebola outbreak in history, showed that it could be imported to other continents, including Russia. In 1993 the Federal State Budgetary Institution “48th Central Scientific Research Institute” of the Russian Ministry of Defence developed a specific equine immunoglobulin for emergency prophylaxis of Ebola in risk groups. The evaluation and improvement of the product’s properties is an important area in the development of biological defence technologies. **The aim of the study** was to examine the properties of the equine anti-Ebola immunoglobulin which had been stored for a long time at 2–8 °C. **Materials and methods:** the authors studied batches of heterologous anti-Ebola immunoglobulin that had been stored for 17–22 years. The properties of the product were evaluated according to the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed. (Ph. Rus. 14 ed.). The specific activity of the product was determined in a plaque reduction neutralisation test using Ebola virus and African green monkey kidney cells (GMK-AH-1(D)). Immunoglobulin molecular parameters were determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography using the test methods described in the European Pharmacopoeia 9.6 and Ph. Rus. 14 ed. **Results:** the storage of anti-Ebola immunoglobulin for 17–22 years at 2–8 °C resulted in a four-fold reduction of the level of virus-neutralising antibodies against Ebola, decrease in the proportion of monomers from 98 to 74–90%, increase in the proportion of dimers and polymers, and formation of immunoglobulin molecules’ fragments. Signs of toxicity for mice were observed in one of the three product batches. **Conclusions:** the obtained results suggest the need to perform more studies to test the quality of anti-Ebola immunoglobulin batches that were stored for shorter periods of time in order to assess the stability of their initial characteristics.

Key words: anti-Ebola immunoglobulin; Ebola haemorrhagic fever; shelf life; specific activity; molecular parameters

For citation: Melnikov SA, Borisevich IV, Rozhdestvenskiy EV, Pantyukhov VB, Chernikova NK, Gordeev EV, Nimirskaya SA, Khmelev AL, Syromyatnikova SI, Shatokhina IV, Plekhanova TM, Timankova GD, Borisevich SV, Kutaev DA, Stovba LF, Mishalova EYu. Properties of heterologous anti-Ebola immunoglobulin after long storage. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(1):50–59. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-50-59>

Corresponding author: Sergey V. Borisevich; 48cnii@mil.ru

Заболевание, вызванное вирусом Эбола рода *Ebolavirus* семейства *Filoviridae* (ЗВВЭ, ранее известное как геморрагическая лихорадка Эбола), является особо опасным инфекционным заболеванием, характеризующимся геморрагиями, мультиорганной недостаточностью, заканчивающимся летальным исходом в 50–90% случаев. Самая большая вспышка лихорадки Эбола в Африке в 2014–2016 гг., в результате которой умерли более 11 тыс. человек, включая завозные случаи заболевания в США и Испании, а также вспышка 2018–2020 гг.¹ ЗВВЭ в восточных районах Демократической Республики Конго подтвердили необходимость разработки средств профилактики и лечения этого заболевания² [1, 2].

В настоящее время активно ведутся исследования по созданию иммунобиологических препаратов для иммунизации людей против ЗВВЭ³ [3]. Реальная опасность завозных случаев ЗВВЭ, а также проведение исследований с вирусом Эбола в научных учреждениях Российской Федерации обуславливают необходимость наличия препаратов для лечения и экстренной профилактики указанного заболевания. Препаратов для эффективного специфического этиотропного лечения ЗВВЭ на сегодняшний день практически не существует [4].

В России имеется несколько специфических средств борьбы с лихорадкой Эбола [5]. Наряду с вакцинами отечественные ученые придавали и придают большое значение разработке средств экстренной профилактики на основе специфических антител, в частности в Государственном реестре лекарственных средств в 1996 г. был зарегистрирован

специфический иммуноглобулин из сыворотки крови лошадей, разработанный в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России [6].

Опыт работы специалистов ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России свидетельствует о том, что залогом успеха приготовления эффективного лошадиного иммуноглобулина является иммунизация животных вирулентным штаммом живого вируса, поскольку наибольшими протективными свойствами будет обладать препарат, содержащий антитела к полному набору полноценных антигенов вируса, вызвавшего заболевание [7, 8]. Получение суспензии возбудителя особо опасной вирусной инфекции и иммунизацию крупных животных производят в условиях, сопряженных с риском для жизни работающих сотрудников. Для получения сыворотки крови лошадей, содержащей вируснейтрализующие антитела (ВНА) к вирусу Эбола на достаточном для приготовления иммуноглобулина уровне, требуется не менее 3–4 месяцев. Кроме того, уровень ВНА зависит от индивидуального иммунного статуса лошади. В целом время приготовления препарата спиртовым фракционированием гамма-глобулинов по Кону с последующей паспортизацией составляет около 12 месяцев⁴. Вместе с тем появление случаев ЗВВЭ предсказать заранее не представляется возможным, поэтому и потребность в иммуноглобулине может возникнуть внезапно. В связи с этим ограничение срока годности иммуноглобулина 3 годами хранения, по нашему мнению, является нерациональным. В 1950–1970 гг., в период интенсивных разработок по созданию сывороточных противовирусных препаратов, в литературе нашли отражение резуль-

¹ <https://www.aerztezeitung.de/Medizin/Kein-Ende-des-Ebola-Ausbruchs-in-der-Demokratischen-Republik-Kongo-in-Sicht-405096.html>

² Ebola virus disease. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease>

³ Ebola vaccine candidates. <https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/ebola-vaccine-candidates/en/>

Preliminary results on the efficacy of rVSV-ZEBOV-GP Ebola vaccine using the ring vaccination strategy in the control of an Ebola outbreak in the Democratic Republic of the Congo: an example of integration of research into epidemic response. <https://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/ebola-ring-vaccination-results-12-april-2019.pdf?ua=1>

Вакцины против геморрагической лихорадки Эбола. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015;14(1):55.

⁴ Экспериментально-производственный регламент № 1134-01. Иммуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей жидкий (Иммуноглобулин лошадиный Эбола), утв. 15.06.2001 начальником ВЦ НИИМ Минобороны России, срок действия до 28.08.2004. Сергиев Посад; 2001.

таты исследований по стабильности их свойств⁵ [9]. Как правило, для сывороток и иммуноглобулинов были установлены короткие сроки годности, не превышающие 2–3 лет⁶. Так, для лошадиных сывороток против клещевого и японского энцефалитов срок годности составлял 2 года, жидкой противогриппозной сыворотки — от 2 до 3 лет, противокоревой сыворотки реконвалесцентов или взрослых — 1–1,5 года⁷.

Результаты изучения стабильности противовирусных антигенов в препаратах, хранившихся при 4 °С, по данным различных авторов, отличаются. Согласно результатам отечественных исследований [10–12], было установлено значительное снижение противовирусной активности в сыворотках или гамма-глобулинах, например против клещевого энцефалита и против гриппа уже через 2–16 месяцев⁸. Результаты исследователей, изучавших свойства иммуноглобулинов, хранившихся в течение 1–7 лет при аналогичных условиях⁹, свидетельствовали о том, что уровень содержания противокоревых, противополиомиелитных и противогриппозных антител оставался без изменений.

Ранее производители иммуноглобулинов рекомендовали по истечению срока годности сыворотки, сохранившие физические свойства, направлять на переконтроль в институт-изготовитель для продления срока годности при условии соответствия препарата требованиям нормативной документации¹⁰.

Разработанные в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России гетерологичные иммуноглобулины (иммуноглобулин лошадиный против лихорадки Марбург, иммуноглобулин против венесуэльского энцефаломиелиита лошадей, противооспенный иммуноглобулин) могли использоваться после истечения срока годности при условии прохождения соответствующего

переконтроля¹¹. При сохранении индекса нейтрализации иммуноглобулина лошадиного против лихорадки Марбург на уровне не ниже 100 срок годности (2 года) продлевали еще на 1 год со дня переконтроля¹². Для иммуноглобулина против венесуэльского энцефаломиелиита лошадей срок годности был установлен 3 года, а при сохранении индекса нейтрализации не ниже 10 000 срок годности препарата продлевали еще на 2 года¹³. Окончательный срок хранения для указанных препаратов не регламентировали. Для противооспенного иммуноглобулина срок годности составлял 8 лет с возможностью продления на 2 года при сохранении специфического титра ВНА не ниже 1:625¹⁴. В настоящее время в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV изд.) для лекарственных средств возможно установление срока годности не более 5 лет¹⁵.

Цель работы — оценить свойства иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей после длительного хранения при температуре от 2 до 8 °С.

Материалы и методы

Материалы. Иммуноглобулин против лихорадки Эбола, из сыворотки крови лошадей, жидкий (иммуноглобулин Эбола), приготовленный в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России и хранившийся при температуре от 2 до 8 °С (табл. 1). Все серии иммуноглобулина Эбола приготовлены по экспериментально-производственному регламенту¹⁶ методом спиртового осаждения на холоду из сыворотки крови лошадей, которых иммунизировали вирусом Эбола, штамм Заир.

⁵ Готовые лекарственные препараты. М.: Медицина; 1965.

Соколов МИ, Павлов ИВ. Справочник по применению вакцин и сывороток. М.: Медгиз; 1961.

Сморodinцев АА. Итоги и задачи специфической профилактики и лечения гриппа. Вестник АМН СССР. 1958;3:20–30.

⁶ Соколов МИ, Павлов ИВ. Справочник по применению вакцин и сывороток. М.: Медгиз; 1961.

Руководство по вакцинному и сывороточному делу. М.: Медицина; 1978.

Кравченко АТ, Салтыков РА, Резепов ФФ. Практическое руководство по применению биопрепаратов. М.: Медицина; 1968.

⁷ Готовые лекарственные препараты. М.: Медицина; 1965.

Соколов МИ, Павлов ИВ. Справочник по применению вакцин и сывороток. М.: Медгиз; 1961.

Сморodinцев АА. Итоги и задачи специфической профилактики и лечения гриппа. Вестник АМН СССР. 1958;3:20–30.

⁸ Ефимова НП. Разработка и экспериментальное обоснование производства препаратов против анаэробных инфекций: дис. ... д-ра мед. наук. Пермь; 1970.

⁹ Бойчук ЛМ, Шикина ЕС, Писарева НА. Вирусные инфекции. В кн.: Труды, посвященные 60-летию чл.-корр. АМН А.А. Смородинцева. Л.; 1961. Т. 21. С. 64–78.

Федорович МИ. Методика изготовления и хранения диагностических сывороток: дис. ... канд. мед. наук. Томск; 1950.

Шадрин АС. Профилактика гриппа донорской сывороткой и плацентарным гамма-глобулином: дис. ... канд. мед. наук. Горький; 1960.

¹⁰ Руководство по вакцинному и сывороточному делу. М.: Медицина; 1978.

¹¹ Инструкция по изготовлению и контролю (Immunoglobulinum contra encephalomyelitidem equinum venesuelensem ex sero equi, fluidus) иммуноглобулина против венесуэльского энцефаломиелиита лошадей из сыворотки лошадей, жидкого, утв. 07.05.1992 начальником ВЦ НИИМ Минобороны России, срок действия до 28.08.2004. Сергиев Посад; 1992.

Лабораторный регламент получения противооспенного гамма-глобулина спиртовым методом, утв. 09.07.1966 председателем комитета вакцин и сывороток. Сергиев Посад; 1966.

Временная фармакопейная статья на иммуноглобулин против болезни Марбург из сыворотки лошадей, жидкий, утв. зам. министра здравоохранения СССР 16.07.1987.

Инструкция по изготовлению и контролю (Immunoglobulinum contra morbus Marburg ex sero equi, fluidum) иммуноглобулина против болезни Марбург из сыворотки лошадей, жидкого, утв. начальником 41 НИИИ и ВП СССР 27.02.1986.

¹² Временная фармакопейная статья на иммуноглобулин против болезни Марбург из сыворотки лошадей, жидкий, утв. зам. министра здравоохранения СССР 16.07.1987.

Инструкция по изготовлению и контролю (Immunoglobulinum contra morbus Marburg ex sero equi, fluidum) иммуноглобулина против болезни Марбург из сыворотки лошадей, жидкого, утв. начальником 41 НИИИ и ВП СССР 27.02.1986.

¹³ Инструкция по изготовлению и контролю (Immunoglobulinum contra encephalomyelitidem equinum venesuelensem ex sero equi, fluidus) иммуноглобулина против венесуэльского энцефаломиелиита лошадей из сыворотки лошадей, жидкого, утв. 07.05.1992 начальником ВЦ НИИМ Минобороны России, срок действия до 28.08.2004. Сергиев Посад; 1992.

¹⁴ Общая фармакопейная статья 1.1.0009.18 Стабильность и сроки годности лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁵ Там же.

¹⁶ Экспериментально-производственный регламент № 1134-01. Иммуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей жидкий (Иммуноглобулин лошадиный Эбола), утв. 15.06.2001 начальником ВЦ НИИМ Минобороны России, срок действия до 28.08.2004. Сергиев Посад; 2001.

Стандартный образец — нормальный лошадиный иммуноглобулин изотипа IgG, лиофилизат 50 мг/амп (Rockland, США), кат. № 008-0102, использовали для оценки молекулярно-массового распределения целевого белка в препаратах иммуноглобулина.

Методы. Показатели качества изучаемых серий иммуноглобулина Эбола оценивали согласно спецификации на препарат.

1. Аномальную токсичность иммуноглобулина серий № 26, 29 и 41 исследовали по методике, представленной в ГФ РФ XIV изд.¹⁷ Иммуноглобулин каждой испытуемой серии вводили 5 белым нелинейным мышам однократно по 1 мл внутривенно и по 3 мл подкожно в оба бока морским свинкам.

2. Специфическую активность препарата (серии № 26, 29 и 41) определяли в реакции нейтрализации с вирусом Эбола в культуре клеток почки африканской зеленой марышки (GMK-АН-1(Д)) методом подавления образования негативных колоний (бляшкообразования). Для постановки реакции нейтрализации использовали трехсуточный монослой указанной культуры на уровне 40–42 пассажа с посевной концентрацией клеток от 200×10^3 до 250×10^3 в 1 мл в культуральных флаконах объемом 25 мл.

3. Испытания на стерильность иммуноглобулина Эбола серий № 26, 29 и 41 проводили в соответствии с ОФС Стерильность¹⁸ методом прямого посева с использованием тигглеклевой среды для выявления аэробных и анаэробных бактерий и грибов. Посевы проб инкубировали при двух температурных режимах ($32,5 \pm 2,5$) и ($22,5 \pm 2,5$) °C в течение 14 сут.

4. Пирогенность иммуноглобулина Эбола серий № 26, 29 и 41 оценивали биологическим методом в соответствии с ОФС Пирогенность¹⁹ на кроликах массой 2,0–3,5 кг.

5. Величину pH иммуноглобулина Эбола серий № 26, 29 и 41 определяли потенциометрически в соответствии с ОФС Ионометрия²⁰.

6. Прозрачность и цветность иммуноглобулина Эбола серий № 26, 29 и 41 определяли в соответствии с ФСП 42-0102-0242-00²¹, электрофоретическую однородность — с ОФС 1.8.2.0009.15²².

7. Содержание белка определяли колориметрическим методом с реактивом Бредфорда (Thermo Scientific) в соответствии с ОФС Определение белка²³.

8. Оценку молекулярно-массового распределения целевого белка в препаратах иммуноглобулина Эбола проводили, используя методику эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), описанную в работе Е. Ю. Мишаловой с соавт. [13].

Основные показатели качества препаратов с разными сроками хранения сравнивали с паспортными характеристиками, определенными на момент изготовления, молекулярные пара-

Таблица 1. Серии иммуноглобулина Эбола, используемые в исследовании

Table 1. Anti-Ebola immunoglobulin batches used in the study

№ п/п No.	Серия Batch	Год приготовления Production year	Продолжительность хранения, год Storage time, years
1	26	1996	22
2	27		
3	28		
4	29		
5	41	2001	17
6	1/09		
7	1/16	2016	2

метры оценивали в сравнении с показателями препарата серии 1/16 с неистекшим сроком годности.

Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)²⁴.

Результаты и обсуждение

На первом этапе изучили свойства трех серий иммуноглобулина Эбола из сыворотки крови лошадей, две из которых (№ 26, 29) были приготовлены в 1996 г. и одна серия (№ 41) — в 2001 г., на предмет соответствия требованиям нормативной документации (ФСП 42-0102-0242-00 и ФС 42-0030-00²⁵). Результаты исследований представлены в таблице 2.

На момент приготовления иммуноглобулин Эбола, серии № 26, 29 и 41, по своим характеристикам соответствовал требованиям нормативной документации. Специфическая активность этих серий по уровню ВНА к вирусу Эбола после длительного хранения снизилась в 4 раза. При этом в препаратах серий № 26 и 41 значения специфической активности оказались ниже значений, указанных в нормативной документации. Результаты исследования аномальной токсичности препарата на белых нелинейных мышках и морских свинок свидетельствовали о появлении токсичности для мышей (погибло 1 из 10 животных) в одной из серий (№ 41) иммуноглобулина Эбола. Анафилактиченность препарата соответствовала требованиям нормативной документации. По всем другим изученным показателям значения также соответствовали требованиям нормативной документации на препарат.

На следующем этапе исследований методом ВЭЖХ были изучены молекулярные параметры иммуноглобулина Эбола серий № 26–29, 41, 1/09, 1/16 с разными сроками хранения (табл. 3). Показано, что в процессе длительного хранения

¹⁷ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0004.15 Аномальная токсичность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁸ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁹ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0005.15 Пирогенность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁰ Общая фармакопейная статья 1.2.1.0004.15 Ионометрия. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²¹ Фармакопейная статья предприятия Иммуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей жидкий / Иммуноглобулин лошадиный Эбола / ФС 42-0030-00, утв. рук. Департамента гос. контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств и медицинской техники Минздрава России 26.07.2000.

²² Общая фармакопейная статья 1.8.2.0009.15 Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

²³ Общая фармакопейная статья 1.2.3.0012.15 Определение белка. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁴ СП 2.2.1.3218-14 Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

²⁵ Фармакопейная статья предприятия Иммуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей жидкий / Иммуноглобулин лошадиный Эбола / ФС 42-0030-00, утв. рук. Департамента гос. контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств и медицинской техники Минздрава России 26.07.2000.

Таблица 2. Результаты изучения качества иммуноглобулина Эбола серий № 26, 29, 41
Table 2. The results of quality control of anti-Ebola immunoglobulin (batches No. 26, 29, 41)

Показатель качества Test parameter	Значение показателя качества Results of quality control					Требование ФС 42-0030-00, ФСП 42-0102-0242-00 Requirements of the monograph FS 42-0030-00, and the manufacturer's product specification FSP 42-0102-0242-00
	после хранения для серии № ... after storage of batch No. ...					
	на момент приготовления для серии № ... immediately after production of batch No. ...	26	29	41	26	
Внешний вид Appearance	Прозрачная светло-желтого цвета жидкость с легко разбивающимся осадком Transparent light yellow liquid with easily breakable sediment	Прозрачная светло-желтого цвета жидкость с легко разбивающимся осадком Transparent light yellow liquid with easily breakable sediment	Прозрачная светло-желтого цвета жидкость с легко разбивающимся осадком Transparent light yellow liquid with easily breakable sediment	Бесцветная прозрачная жидкость с легко разбивающимся осадком Colourless transparent liquid with easily breakable sediment	Прозрачная светло-желтого цвета жидкость с легко разбивающимся осадком Transparent light yellow liquid with easily breakable sediment	Бесцветная прозрачная жидкость с легко разбивающимся осадком Colourless transparent liquid with easily breakable sediment
Подлинность: Identification: - наличие гамма-глобулиновой фракции, % - presence of gamma globulin fraction, % - титр специфических антител к вирусу Эбола - titre of specific antibodies against Ebola virus	93,0 1 : 8192	97,0 1 : 16384	98,0 1 : 8192	91,0 1 : 2048	96,0 1 : 4096	95,5 1 : 2048
Прозрачность Clarity	0,03	0,03	0,02	0,03	0,04	0,03
Цветность Colority	0,06	0,09	0,07	0,05	0,10	0,08
Отсутствие механических включений Absence of particulate matter	Механические включения отсутствуют No particulate matter	Механические включения отсутствуют No particulate matter	Механические включения отсутствуют No particulate matter	Механические включения отсутствуют No particulate matter	Механические включения отсутствуют No particulate matter	Механические включения отсутствуют No particulate matter
pH	7,20	7,10	7,20	7,15	7,00	7,10
pH	От 7,00 до 7,50 Between 7.00 and 7.50					

Свойства гетерологичного иммуноглобулина против лихорадки Эбола после длительного хранения
Properties of Heterologous anti-Ebola Immunoglobulin after Long Storage

Продолжение таблицы 2

Показатель качества Test parameter	Значение показателя качества Results of quality control					Требование ФС 42-0030-00, ФС 42-0102-0242-00 Requirements of the monograph FS 42-0030-00, and the manufacturer's product specification FSP 42-0102-0242-00	
	на момент приготовления для серии № ... immediately after production of batch No. ...	26	29	41	26		29
Герметизация Integrity	Ампулы герметичны Ampoules are tightly sealed	Ампулы герметичны Ampoules are tightly sealed	Ампулы герметичны Ampoules are tightly sealed	Ампулы герметичны Ampoules are tightly sealed	Ампулы герметичны Ampoules are tightly sealed	Ампулы герметичны Ampoules are tightly sealed	Ампулы должны быть герметично запаяны в атмосфере стерильного воздуха Ampoules are tightly sealed under sterile air conditions
Белок Protein	10,6	10,4	11,0	10,6	10,4	11,0	10,0 ± 1,0%
Электрофоретическая однородность Electrophoretic homogeneity	93,0	97,0	98,0	91,0	96,0	95,5	Содержание гамма-глобулиновой фракции должно быть не менее 90,0% от общего количества белка. Допустимо наличие в препарате альбумина, альфа- и бета-глобулинов сыворотки крови в количестве не более 10,0% The gamma globulin fraction is at least 90.0% of the total protein content. The product may contain albumin, blood serum alpha- and beta-globulins in the amount of not more than 10.0%
Примеси, %: Impurities, %: - этиловый спирт - ethyl alcohol - натрия хлорид - sodium chloride	3,87 0,66	4,00 0,98	3,94 0,80	Н.о. ND Н.о. ND	Н.о. ND Н.о. ND	Н.о. ND Н.о. ND	Не более 4,0 Not more than 4,0 0,90 ± 0,05
Стерильность Sterility	Стерилен Sterile	Стерилен Sterile	Стерилен Sterile	Стерилен Sterile	Стерилен Sterile	Стерилен Sterile	Препарат должен быть стерильным The product is sterile
Пирогенность Pyrogenicity	Апирогенен Pyrogen-free	Апирогенен Pyrogen-free	Апирогенен Pyrogen-free	Апирогенен Pyrogen-free	Апирогенен Pyrogen-free	Апирогенен Pyrogen-free	Препарат должен быть апирогенным The product is pyrogen-free
Токсичность Toxicity	Не токсичен для мышей Non-toxic for mice	Не токсичен для мышей Non-toxic for mice	Не токсичен для мышей Non-toxic for mice	Не токсичен для мышей и морских свинок Non-toxic for mice and guinea pigs	Не токсичен для мышей и морских свинок Non-toxic for mice and guinea pigs	Токсичен для мышей и морских свинок Toxic for mice and guinea pigs	Должен быть не токсичен для мышей и морских свинок The product is non-toxic for mice and guinea pigs
Специфическая активность (титр вируснейтрализирующих антител) Specific activity (titre of virus-neutralising antibodies)	1 : 8192	1 : 16384	1 : 8192	1 : 2048	1 : 4096	1 : 2048	Должен быть не ниже 1 : 4096 Not less than 1 : 4096

Примечание. Серии иммуноглобулина Эбола № 26 и 29 хранились в течение 22 лет, серия № 41 — 17 лет. Все изучаемые серии препарата хранились при температуре от 2 до 8 °С. Представлены значения единичных определений. «Н.о.» — не определяли.
Note. Anti-Ebola immunoglobulin batches No. 26 and 29 were stored for 22 years, batch No. 41 was stored for 17 years. All the tested batches were stored at 2–8 °C. All data are from single determinations. ND—not determined.

Таблица 3. Результаты изучения молекулярных параметров иммуноглобулина Эбола
Table 3. The results of determination of molecular parameters of anti-Ebola immunoglobulin

Параметр Test parameter	Значение параметра для серии иммуноглобулина № ... (срок хранения) Result for immunoglobulin batch No. ... (shelf life)							
	Стандарт* Reference standard*	26 (22 года) (22 years)	27 (22 года) (22 years)	28 (22 года) (22 years)	29 (22 года) (22 years)	41 (17 лет) (17 years)	109 (17 лет) (17 years)	1/16 (2 года) (2 years)
Время удерживания пика, мин: Peak retention time, min:								
- полимеров - polymers	10,044	9,943	9,929	10,011	10,019	10,049	10,122	10,087
- димеров - dimers	12,123	12,411	12,664	12,471	12,477	12,548	12,511	Не выявлены Not identified
- мономеров - monomers	14,583	14,974	14,979	14,910	14,982	15,032	15,191	15,07
- фрагментов - fragments	Не выявлены Not identified	Не выявлены Not identified	18,395	Не выявлены Not identified	18,309	Не выявлены Not identified	Не выявлены Not identified	Не выявлены Not identified
Содержание компонента иммуноглобулина в растворе, %: The content of immunoglobulin component in the solution, %:								
- полимеров - polymers	3,399	7,290	9,216	12,798	6,256	3,919	3,050	1,559
- димеров - dimers	7,125	8,174	4,148	8,834	6,517	6,509	6,875	Не выявлены Not identified
- мономеров - monomers	89,476	84,536	73,743	78,368	76,674	89,572	90,075	98,441
- фрагментов - fragments	Не выявлены Not identified	Не выявлены Not identified	12,892	Не выявлены Not identified	10,553	Не выявлены Not identified	Не выявлены Not identified	Не выявлены Not identified

Примечание. Представлены значения единичных определений.

* Нормальный лошадиный иммуноглобулин.

Note. All data are from single determinations.

* Normal immunoglobulin from horse.

иммуноглобулина Эбола в составе исследованных серий препарата снизилась доля мономеров, возросли доли димеров и полимеров. Кроме того, в составе серий № 27 и 29 препарата, хранившихся в течение 22 лет, появились фрагменты молекул иммуноглобулина. Агрегация и фрагментация белковых молекул являются основными процессами, ухудшающими качество иммуноглобулинов при хранении, причем эти процессы в значительной степени обусловлены исходными свойствами препарата, в частности присутствием в нем лабильных липопротеидов, прооксидантов и остаточных количеств этилового спирта [14, 15]. Представленные в таблице 3 результаты по изменению молекулярных параметров хранившихся длительное время серий иммуноглобулина, с одной стороны, подтверждают наличие этих процессов [14], а с другой — свидетельствуют о достаточно высокой степени очистки и хорошем качестве изучаемого препарата, поскольку в аналогичном жидком гетерологичном антирабическом иммуноглобулине соотношение мономеров, агрегатов и фрагментов изменялось в значительной степени уже через 5 лет хранения при температуре от 2 до 8 °С [16]. Вероятно, изменение доли мономеров и конформационной структуры белка иммуноглобулина Эбола привело к снижению его исходной специфической активности, а в одном случае — к появлению токсических свойств (табл. 2). Примечательно, что одна из серий иммуноглобулина против лихорадки Эбола, приготовленного методом спиртового осаждения, после хранения в течение 17–22 лет при температуре от 2 до 8 °С полностью соответствовала требованиям нормативной документации (определение молекулярных параметров ранее не было предусмотрено, поскольку, согласно ГФ РФ XIV изд., данный показатель до сих пор не является обязательным для гетерологичных иммуноглобулинов), что ни в коем случае не является основанием для применения такого препарата по медицинским показаниям, за исключением экстраординарных ситуаций.

Результаты эксперимента подтверждают целесообразность включения оценки молекулярных параметров в будущем в перечень обязательно контролируемых для всех иммуноглобулинов, поскольку значения молекулярных параметров взаимосвязаны с биологическими свойствами препарата.

Одним из путей повышения стабильности иммунобиологических лекарственных препаратов, помимо увеличения степени их очистки, является также использование сублимационного высушивания²⁶, что следует иметь в виду при совершенствовании процессов производства специфических лошадиных иммуноглобулинов и в первую очередь гетерологичных иммуноглобулинов против особо опасных геморрагических лихорадок.

Выводы

Результаты изучения иммуноглобулина Эбола серий № 26, 29 и 41, хранившихся в течение 17–22 лет при температуре от 2 до 8 °С, свидетельствуют о снижении уровня специфической активности (титр ВНА) практически в 4 раза и о вероятности появления токсичности препарата. Титр ВНА иммуноглобулина серий № 26 и 41 (1:2048) был ниже допустимого (1:4096), а в препарате серии № 41 выявлена токсичность для белых нелинейных мышей и морских свинок. Иммуноглобулин серии № 29 после длительного хранения по всем характеристикам соответствовал требованиям нормативной документации. Применение эксклюзивной ВЭЖХ позволило определить направленность изменений молекулярных параметров. В процессе

хранения в составе иммуноглобулина Эбола снижалась доля мономеров, возрастали доли димеров и полимеров, а также появлялись фрагменты молекул иммуноглобулина.

Показана взаимосвязь уменьшения доли мономерной фракции и появления димеров в процессе хранения иммуноглобулина со снижением его исходной специфической активности.

Целесообразно продолжение исследований по изучению качества препарата, хранившегося менее продолжительные сроки, с целью оценки стабильности его свойств.

Вклад авторов. **С. А. Мельников** — иммунизация лошадей и приготовление серий иммуноглобулина в 2001 и 2016 гг., написание, доработка текста; **И. В. Борисевич** — иммунизация лошадей, разработка препарата иммуноглобулина, приготовление серий и оценка свойств в 1996 г.; **Е. В. Рождественский** — иммунизация лошадей и приготовление серий иммуноглобулина в 2016 г.; **В. Б. Пантюхов** — приготовление и паспортизация культуры вируса Эбола для иммунизации лошадей, иммунизация в 2001 г.; **Н. К. Черникова** — оценка биологических свойств серий иммуноглобулина в 1996 и 2016 гг., консультативная помощь в написании текста, доработка текста; **Е. В. Гордеев** — разработка метода ВЭЖХ для гетерологичных иммуноглобулинов и оценка их молекулярных параметров; **С. А. Нимирская** — выделение и очистка иммуноглобулина в 2016 г., определение физико-химических характеристик, стерильности и пирогенности хранившихся серий иммуноглобулина; **А. Л. Хмелев** — иммунизация лошадей в 2001 г., проведение анализа методом ВЭЖХ; **С. И. Сыромятникова** — определение специфической безопасности сыворотки и специфической активности серий иммуноглобулина в 2016 г.; **И. В. Шатохина** — определение специфической безопасности сыворотки и специфической активности серий иммуноглобулина в 2001 и 2016 гг.; **Т. М. Плеханова** — определение электрофоретической однородности серий иммуноглобулина; **Г. Д. Тиманькова** — выделение и очистка иммуноглобулина в 1996 г. и оценка его физико-химических свойств; **С. В. Борисевич** — разработка дизайна исследования, консультативная помощь в анализе результатов и оценке состояния проблемы, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; **Д. А. Кутаев** — участие в разработке дизайна исследования и обсуждении полученных результатов; **Л. Ф. Стомба** — анализ литературы и участие в корректировке статьи; **Е. Ю. Мишалова** — проведение анализа ВЭЖХ серий иммуноглобулина.

Authors' contributions. **Sergey A. Melnikov**—immunisation of horses and preparation of immunoglobulin batches in 2001 and 2016, writing and revising the text; **Igor V. Borisevich**—immunisation of horses, development of the immunoglobulin product, preparation of batches and assessment of their properties in 1996; **Evgeniy V. Rozhdestvensky**—immunisation of horses and preparation of immunoglobulin batches in 2016; **Vladimir B. Pantyukhov**—preparation and certification of Ebola virus culture for immunisation of horses, performing immunisation in 2001; **Natalya K. Chernikova**—evaluation of biological properties of immunoglobulin batches in 1996 and 2016, consultation on writing the text, revising the text; **Evgeniy V. Gordeev**—development of the HPLC method for heterologous immunoglobulins and assessment of their molecular parameters; **Svetlana A. Nimirskaya**—isolation and purification of immunoglobulins in 2016, determination of physicochemical properties, sterility, and pyrogenicity of the stored immunoglobulin batches; **Aleksey L. Khmelev**—immunisation of horses in 2001, performing HPLC testing; **Svetlana I. Syromyatnikova**—determination of specific safety of the serum and specific activity of immunoglobulin batches in 2016; **Irina V. Shatokhina**—determination

²⁶ Кочкалова НН. Разработка технологии лиофильного высушивания гетерологичного антирабического иммуноглобулина: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов; 2015.

of specific safety of the serum and specific activity of immunoglobulin batches in 2001 and 2016; **Tamara M. Plekhanova**—determination of electrophoretic homogeneity of immunoglobulin batches; **Galina D. Timankova**—isolation and purification of immunoglobulin in 1996 and determination of its physicochemical properties; **Sergey V. Borisevich**—development of the research design, consultation on and assistance in the analysis of the obtained results and the current state of the problem, final approval of the text for publication; **Dmitry A. Kutaev**—participation in the development of the research design and discussion of the obtained results; **Lyudmila F. Stovba**—literature review and participation in the finalisation of the text; **Ekaterina Yu. Mishalova**—performing HPLC testing of immunoglobulin batches.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. This study was carried out with no external funding.

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

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

Литература/References

- Щелканов МЮ, Зуманиги Н, Буаро МЙ, Малеев ВВ. Пять мифов о лихорадке Эбола: где кончается вымысел? В кн.: Попова АЮ, ред. *Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет*. СПб.: Изд-во ФБУН НИИЭМ им. Пастера; 2017. С. 74–85. [Shchelkanov MYu, Zoumanigui N, Boiro MYe, Maleev VV. Five myths about Ebola: Where does fiction end? In: Popova AYU, ed. *Actual infections in the Republic of Guinea: Epidemiology, diagnosis and immunity*. St. Petersburg: Saint-Petersburg Pasteur Institute Press; 2017. P. 74–85 (In Russ.)]
- Щелканов МЮ, Магассуба НФ, Дедков ВГ, Шипулин ГА, Галкина ИВ, Попова АЮ, Малеев ВВ. Природный резервуар филловирюсов и типы связанных с ними эпидемических вспышек на территории Африки. В кн.: Попова АЮ, ред. *Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет*. СПб.: Изд-во ФБУН НИИЭМ им. Пастера; 2017. С. 46–55. [Shchelkanov MYu, Magassouba N, Dedkov VG, Shipulin GA, Galkina IV, Popova AYU, Maleev VV. Natural reservoir of filoviruses and types of associated epidemic outbreaks in Africa. In: Popova AYU, ed. *Actual infections in the Republic of Guinea: Epidemiology, diagnosis and immunity*. St. Petersburg: Saint-Petersburg Pasteur Institute Press; 2017. P. 46–55 (In Russ.)]
- Suschak JJ, Schmaljohn CS. Vaccines against Ebola virus and Marburg virus: recent advances and promising candidates. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(10):2359–77. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1651140>
- Никифоров ВВ, Шахмарданов МЗ. Клинико-эпидемиологическая характеристика лихорадки Эбола на современном этапе. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2016;21(1):51–7. [Nikiforov VV, Shakhmardanov MZ. Clinical and epidemiological characteristics of Ebola at the present stage. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases, Russian Journal*. 2016;21(1):51–7 (In Russ.)]
- Попова АЮ, Кутырев ВВ, ред. *Ликвидация эпидемии Эбола в Гвинейской Республике: опыт работы специализированной противэпидемической бригады Роспотребнадзора*. М.: ООО «Творческий информационно-издательский центр»; 2016. [Popova AYU, Kutuyrev VV, eds. *Containment of Ebola epidemic in the Republic of Guinea: operational experience of the specialized anti-epidemic team of the Rospotrebnadzor*. Moscow: ООО "Tvorcheskiy informacionno-izdatel'skiy tsent"; 2016 (In Russ.)]
- Борисевич ИВ, Краснянский ВП, Михайлов ВВ, Потрываева НВ, Градобоев ВН, Тиманькова ГД, Карелов ЮМ. Разработка и получение иммуноглобулина против лихорадки Эбола. *Межведомственная конференция «Изучение и профилактика особо опасных вирусных инфекций»* Коллецово, 7–8 апреля 1993 г. Новосибирск: изд-во НПО «Вектор»; 1993. [Borisevich IV, Krasnyansky VP, Mikhaylov VV, Potryvaeva NV, Gradoboev VN, Timankova GD, Karelov YuM. Development and production of anti-Ebola immunoglobulin. *Multi-agency conference "Study and prevention of highly hazardous viral infections" Koltsovo, April 7–8, 1993*. Novosibirsk: publishing house NPO "Vektor"; 1993 (In Russ.)]
- 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. [Borisevich IV, Potryvaeva NV, Melnikov SA, Yevseyev AA, Krasnyansky VP, Maksimov VA. Design of equine serum-based Marburg virus immunoglobulin. *Voprosy virusologii = Problems of virology*. 2008;53(1):39–41 (In Russ.)]
- Краснянский ВП, Градобоев ВН, Борисевич ИВ, Потрываева НВ, Лебединская ЕВ, Черникова НК, Тиманькова ГД. Разработка и изучение свойств иммуноглобулина против лихорадки Ласса. *Вопросы вирусологии*. 1997;42(4):168–71. [Krasnyansky VP, Gradoboev VN, Borisevich IV, Potryvaeva NV, Lebedinskaya EV, Chernikova NK, Timankova GD. Development and study of the properties of immunoglobulin against Lassa fever. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 1997;42(4):168–71 (In Russ.)]
- Васильева ОА, Турлянцева НГ, Матвеевко ММ. Влияние различных температур на стабильность титра гамма-глобулина против клещевого энцефалита. *Вопросы эпидемиологии, микробиологии и иммунологии*. 1964;15:280–2. [Vasilyeva OA, Turlyantseva NG, Matveenko MM. The influence of temperatures on immunoglobulin against tick-born encephalitis stability. *Voprosy epidemiologii, mikrobiologii i immunologii = Issues of Epidemiology, Microbiology and Immunology*. 1964;15:280–2 (In Russ.)]
- Тюшнякова МК. Хранение иммунных сывороток против клещевого энцефалита в сухом виде. *Вопросы вирусологии*. 1958;4:247–8. [Tyushnyakova MK. Storage of dry immune sera against tick-born encephalitis. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 1958;4:247–8 (In Russ.)]
- Алексеева ТН, Антонова ЛН, Захарьевская НС. Изучение содержания антител к вирусам гриппа, полиомиелита и к гемолитическому стрептококку в плацентарных сыворотках и гамма-глобулинах, выпускаемых горьковским институтом эпидемиологии и гигиены. В кн.: *Тезисы межинститутской научной конференции «Вопросы сывороточного производства»*. М.: Бюро научной информации; 1960. С. 61–2. [Alekseeva TN, Antonova LN, Zaharyevskaya NS. The study of the content of antibodies against influenza viruses, poliomyelitis and hemolytic streptococcus in placental sera and gamma globulins produced by Gorky Institute of Epidemiology and Hygiene. In: *Abstracts of the Inter-institutional Scientific Conference "Issues of sera production"*. Moscow: Vyuro nauchnoy informatsii; 1960. P. 61–2 (In Russ.)]
- Мельникова АИ, Ногичева МН, Шадрин АС. Изучение содержания противогриппозных антител на разных этапах изготовления противокоревой сыворотки и в процессе хранения. В кн.: *Тезисы межинститутской научной конференции «Вопросы сывороточного производства»*. М.: Бюро научной информации; 1960. [Melnikova AI, Nogicheva MN, Shadrin AS. The study of the content of anti-influenza antibodies at different stages of anti-measles serum production and storage. In: *Abstracts of the Inter-institutional Scientific Conference "Issues of sera production"*. Moscow: Vyuro nauchnoy informatsii; 1960 (In Russ.)]
- Мишалова ЕЮ, Гордеев ЕВ, Лебедев ВН, Мельников СА, Нимирская СА, Борисевич СВ. Апробация методики эксклюзионной хроматографии для оценки молекуляр-

- ных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):261–67. [Mishalova EYu, Gordeev EV, Lebedev VN, Melnikov SA, Nimirskaya SA, Borisevich SV. Experimental testing of a size-exclusion chromatography method used for evaluation of molecular parameters of equine anti-Ebola immunoglobulin. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):261–67] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-261-267>
14. Благородов СГ, Шепелев АП, Воронин СС. Стабилизация физико-химических свойств препаратов иммуноглобулинов при хранении. В кн.: *Иммунобиологические препараты*. М.; 1989. С. 38–43. [Blagorodov SG, Shepelev AP, Voronin SS. Stabilisation of physico-chemical properties of immunoglobulin products during storage. In: *Immunobiologicheskie preparaty*. Moscow; 1989. P. 38–43 (In Russ.)]
15. Змачинская ТБ, Анастасиев ВВ. Оптимизация технологической схемы получения препаратов иммуноглобулинов для внутримышечного введения. *Вестник Нижегородского университета имени Н.И. Лобачевского. Серия: Биология*. 2001;(1):70–3. [Zmachinskaya TB, Anastasiev VV. Optimization of the technological scheme of production of immunoglobulin products for intramuscular injection. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta imeni N.I. Lobachevskogo. Seriya Biologiya = Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod. Series: Biology*. 2001;(1):70–3 (In Russ.)]
16. Абрамова ЕГ, Никифоров АК, Киреев МН, Кочкалова НН, Генералов СВ, Селезнева АГ и др. Определение молекулярных параметров препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина методом гель-фильтрации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010;4(106):54–7. [Abramova EG, Nikiforov AK, Kireev MN, Kochkalova NN, Generalov SV, Selezneva AG, et al. Determination of the molecular parameters of heterologous anti-rabies immunoglobulin using gel-filtration. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2010;4(106):54–7 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Мельников Сергей Алексеевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. *Sergey A. Melnikov*, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф. *Igor V. Borisevich*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-0713-7419>

Рождественский Евгений Всеволодович, канд. биол. наук. *Evgeniy V. Rozhdestvensky*, Cand. Sci. (Biol.)

Пантохов Владимир Борисович, канд. мед. наук. *Vladimir B. Pantukhov*, Cand. Sci. (Med.). **SPIN-код:** 8012-8156

Черникова Наталья Константиновна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. *Natalya K. Chernikova*, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate

Гордеев Евгений Васильевич. *Evgeniy V. Gordeev*

Нимирская Светлана Александровна, канд. мед. наук. *Svetlana A. Nimirskaya*, Cand. Sci. (Med.)

Хмелев Алексей Леонидович, канд. мед. наук. *Aleksey L. Khmelev*, Cand. Sci. (Med.)

Сыромятникова Светлана Ивановна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. *Svetlana I. Syromyatnikova*, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate

Шатохина Ирина Викторовна, канд. мед. наук. *Irina V. Shatokhina*, Cand. Sci. (Med.)

Плеханова Тамара Михайловна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. *Tamara M. Plekhanova*, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate

Тиманькова Галина Дмитриевна. *Galina D. Timankova*

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., член-корр. РАН. *Sergey V. Borisevich*, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Corr. Member of RAS. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Кутаев Дмитрий Анатольевич, канд. биол. наук. *Dmitry A. Kutaev*, Cand. Sci. (Biol.)

Стовба Людмила Федоровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. *Lyudmila F. Stovba*, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate

Мишалова Екатерина Юрьевна. *Ekaterina Yu. Mishalova*

Поступила 25.12.2018

После доработки 10.02.2020

Принята к публикации 14.02.2020

Received 25 December 2018

Revised 10 February 2020

Accepted 14 February 2020

Защита мышей от заражения вирусом гриппа птиц субтипа H7 с помощью иммунизации рекомбинантным аденовирусом, кодирующим консервативные антигены вируса гриппа A

Е. С. Седова*, Л. В. Верховская, Э. А. Артемова, Д. Н. Щербинин, А. А. Лысенко, И. А. Руднева, А. В. Ляшко, С. А. Алексеева, И. Б. Есмагамбетов, Т. А. Тимофеева, М. М. Шмаров

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

Грипп — высококонтагиозное заболевание, вызывающее ежегодные эпидемии и через неравные интервалы времени — пандемии. Источником вновь возникающих пандемических штаммов, как правило, являются птицы, а наибольшее беспокойство в настоящее время вызывают высокопатогенные вирусы гриппа птиц субтипа H7. **Цель работы:** оценить способность рекомбинантного аденовируса человека пятого серотипа, экспрессирующего гены высококонсервативных антигенов вируса гриппа A (ионного канала M2 и нуклеопротеина NP), обеспечивать защиту от заражения лабораторных мышей летальной дозой вируса гриппа птиц субтипа H7. Для достижения цели необходимо было адаптировать для размножения в легких мышей вирус гриппа A субтипа H7, охарактеризовать и с его помощью оценить защитные свойства рекомбинантного аденовируса. **Материалы и методы:** вирус гриппа птиц A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2) был адаптирован для размножения в легких мышей путем многократного пассирования. Этот штамм был секвенирован и охарактеризован в реакции гемагглютинации, установлены его ЭИД₅₀ и ЛД₅₀ для лабораторных мышей. Для изучения защитных свойств рекомбинантного аденовируса мыши линии BALB/c были иммунизированы аденовирусом Ad5-tet-M2NP однократно интраназально и через 21 сутки после иммунизации заражены летальной дозой (5 ЛД₅₀) вируса гриппа птиц A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2). Уровень вирусыведения из легких мышей был оценен на 3 и 6 сутки после заражения с помощью титрования гомогенатов легких на культуре клеток MDCK. Уровень специфических антител к вирусу гриппа птиц субтипа H7 определяли методом непрямого иммуноферментного анализа. **Результаты:** иммунизация мышей аденовирусом Ad5-tet-M2NP при наличии симптомов заболевания (снижение массы тела) обеспечила 100% выживаемость животных после заражения летальной дозой (5 ЛД₅₀) вируса гриппа птиц субтипа H7. Продемонстрирован высокий поствакцинальный уровень гуморального иммунного ответа к вирусу гриппа птиц субтипа H7. Показано, что в легких мышей из группы, иммунизированной Ad5-tet-M2NP, уже к 6 суткам наблюдалось существенное снижение титра вируса гриппа птиц субтипа H7 по сравнению с контрольной группой. **Заключение:** рекомбинантный аденовирус Ad5-tet-M2NP может быть использован для создания потенциальной пандемической противогриппозной вакцины, в том числе и от вирусов гриппа птиц субтипа H7. **Ключевые слова:** вирус гриппа птиц субтипа H7; рекомбинантный аденовирус человека; противогриппозная вакцина; консервативные антигены вируса гриппа; иммунизация; выживаемость; поствакцинальный уровень гуморального иммунного ответа

Для цитирования: Седова ЕС, Верховская ЛВ, Артемова ЭА, Щербинин ДН, Лысенко АА, Руднева ИА, Ляшко АВ, Алексеева СА, Есмагамбетов ИБ, Тимофеева ТА, Шмаров ММ. Защита мышей от заражения вирусом гриппа птиц субтипа H7 с помощью иммунизации рекомбинантным аденовирусом, кодирующим консервативные антигены вируса гриппа A. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(1):60–67. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-60-67>
Контактное лицо: Седова Елена Сергеевна; sedova-es@yandex.ru

Protecting Mice from H7 Avian Influenza Virus by Immunisation with a Recombinant Adenovirus Encoding Influenza A Virus Conserved Antigens

E. S. Sedova*, L. V. Verkhovskaya, E. A. Artemova, D. N. Shcherbinin, A. A. Lysenko, I. A. Rudneva, A. V. Lyashko, S. A. Alekseeva, I. B. Esmagamбетov, T. A. Timofeeva, M. M. Shmarov

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

Influenza is a highly contagious disease that causes annual epidemics and occasional pandemics. Birds are believed to be the source of newly emerging pandemic strains, including highly pathogenic avian influenza viruses of the subtype H7. **The aim of the study:** to evaluate the ability of the recombinant human adenovirus, serotype 5,

which expresses genes of influenza A highly conserved antigens (ion channel M2 and nucleoprotein NP), to provide protection to laboratory mice against infection with a lethal dose of avian influenza virus, subtype H7. To achieve this goal, it was necessary to adapt influenza A virus, subtype H7 for reproduction in the lungs of mice, to characterise it, and to use it for evaluation of the protective properties of the recombinant adenovirus. **Materials and methods:** avian influenza virus A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2) was adapted for reproduction in the lungs of mice by repeated passages. The adapted strain was sequenced and assessed using hemagglutination test, EID_{50} and LD_{50} for laboratory mice. BALB/c mice were immunised once with Ad5-tet-M2NP adenovirus intranasally, and 21 days after the immunisation they were infected with a lethal dose (5 LD_{50}) of influenza virus A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2) in order to assess the protective properties of the recombinant adenovirus. The level of viral shedding from the lungs of the infected mice was evaluated by titration of the lung homogenates in MDCK cell culture on days 3 and 6 after infection. The level of specific antibodies to H7 avian influenza virus was determined by indirect enzyme immunoassay. **Results:** the use of Ad5-tet-M2NP adenovirus for immunisation of the mice ensured 100% survival of the animals that had disease symptoms (weight loss) after their infection with the lethal dose (5 LD_{50}) of H7 avian influenza virus. The study demonstrated a high post-vaccination level of humoral immune response to H7 avian influenza virus. The virus titer decreased significantly by day 6 in the lungs of mice that had been immunised with Ad5-tet-M2NP compared to the control group. **Conclusion:** the Ad5-tet-M2NP recombinant adenovirus can be used to create a candidate pandemic influenza vaccine that would protect against avian influenza viruses, subtype H7, in particular.

Key words: H7 influenza A virus; recombinant human adenovirus; influenza vaccine; influenza virus conserved antigens; immunisation; survival; post-vaccination level of humoral immune response

For citation: Sedova ES, Verkhovskaya LV, Artemova EA, Shcherbinin DN, Lysenko AA, Rudneva IA, Lyashko AV, Alekseeva SA, Esmagambetov IB, Timofeeva TA, Shmarov MM. Protecting mice from H7 avian influenza virus by immunisation with a recombinant adenovirus encoding influenza A virus conserved antigens. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(1):60–67. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-60-67>

Corresponding author: Elena S. Sedova; sedova-es@yandex.ru

Грипп — высококонтагиозное заболевание, вызывающее ежегодные эпидемии по всему миру, а через неравные интервалы времени — пандемии. Самая масштабная пандемия вируса гриппа — «испанка» 1918 г. — унесла жизни более 50 млн человек [1]. Источником вновь возникающих штаммов, вызывающих пандемии, как правило, являются птицы, а также домашние свиньи, в организме которых возможна реассортация вирусов, циркулирующих как среди людей, так и среди птиц [2]. Так, источником вируса гриппа А H1N1, вызвавшего пандемию в 2009 г., стали свиньи, а пандемичный штамм был реассортантом, содержащим гены птичьего, человеческого и свиного вирусов [3]. Также источником возможной пандемии могут стать высокопатогенные вирусы гриппа птиц, случаи заражения людей которыми фиксируются с 1997 г. Начиная с 2003 г. регулярно сообщается о случаях заражения людей высокопатогенным вирусом гриппа птиц субтипа H5N1, и к 2019 г. зафиксирован 861 случай заражения человека, из которых летальным исходом закончились 455¹. Также большое беспокойство вызывает высокопатогенный вирус гриппа птиц субтипа H7N9, случаи заражения которым наблюдаются с 2013 г. Было зафиксировано 1569 лабораторно подтвержденных случаев заражения этим вирусом², из них 615 закончились летальным исходом³. Если высокопатогенные вирусы птиц в результате мутаций или реассортации приобретут способность передаваться от человека к человеку, это может привести к началу серьезной пандемии [4]. В связи с этим актуальным является разработка противогриппозных вакцин широкого спектра действия, способных защищать в том числе от высокопатогенных вирусов гриппа птиц.

Одной из возможных стратегий, позволяющих расширить спектр действия противогриппозных вакцин, является так называемая генетическая вакцинация с помощью плазмид или вирусных векторов, то есть введение генетического материала, обеспечивающего продукцию в организме целевых антигенов

патогена [5]. Генетические вакцины обеспечивают экспрессию генов белков патогена непосредственно в клетках организма, при этом структура целевых антигенов остается максимально близкой к их нативной структуре, что позволяет достичь иммунного ответа более широкого спектра действия [6]. Одним из наиболее популярных векторов для создания генетических вакцин является рекомбинантный аденовирус человека пятого серотипа. Рекомбинантный аденовирус человека пятого серотипа обеспечивает высокий уровень экспрессии целевого транскгена в клетке-мишени и способен трансдуцировать как делящиеся, так и постмитотические клетки. Аденовирусные векторы индуцируют высокие уровни как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. При этом ДНК аденовируса остается во внехромосомной форме. Подробные данные о структуре, физико-химических и биологических свойствах аденовируса человека пятого серотипа позволяют говорить о его безопасности для создания рекомбинантных вакцин [7].

Ранее нами был разработан рекомбинантный аденовирус человека пятого серотипа, экспрессирующий гены высококонсервативных антигенов вируса гриппа А (ионного канала M2 и нуклеопротеина NP) [8]. Было показано, что аденовирус Ad5-tet-M2NP защищает лабораторных мышей от заражения вирусами гриппа А человека, птиц и свиней субтипов H1N1, H3N2, H2N3, H5N2 и H9N2, вызывая формирование высокого уровня как клеточного, так и гуморального иммунного ответа [9]. Однако отсутствовали данные по оценке возможного защитного действия против вируса гриппа птиц субтипа H7.

Цель работы — оценить способность рекомбинантного аденовируса человека пятого серотипа, экспрессирующего гены высококонсервативных антигенов вируса гриппа А (ионного канала M2 и нуклеопротеина NP), обеспечивать защиту от заражения лабораторных мышей летальной дозой вируса гриппа птиц субтипа H7.

¹ Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003–2019. https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2019_06_24_tableH5N1.pdf?ua=1

² Monthly Risk Assessment Summary. https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/HAI_Risk_Assessment/en

³ Human infection with avian influenza A(H7N9) virus — China: Update. WHO; 2018. <https://www.who.int/csr/don/05-september-2018-ah7n9-china/en/>

Материалы и методы

Лабораторные животные. Для адаптации вируса гриппа к размножению в легких мышей использовали белых беспородных мышей с массой тела 10 г (Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России). Для оценки летальной дозы вируса гриппа использовали мышей линии BALB/c с массой тела 18–20 г, самки (Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России). Для проведения опытов по определению протективных и иммуногенных свойств рекомбинантного аденовируса использовали мышей линии BALB/c с массой тела 14–16 г, самки (НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, Россия). Животных содержали в виварии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России в соответствии с действующими правилами⁴. Эвтаназию животных проводили в соответствии с Европейской Директивой 2010/63 с помощью углекислого газа [10].

Вирусы. Вирус гриппа птиц (вирусоносительная аллантаическая жидкость) A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2) (GenBank № EU743253–EU743260) был предоставлен лабораторией молекулярной биологии вирусов гриппа ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН».

Вирус A/Chicken/NJ/294508-12/2004-CI (H7N2) был получен в результате однократного клонирования вируса A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2) в куриных эмбрионах методом предельных разведений. Для этого после заражения вирусом куриные эмбрионы инкубировали 48 ч при 37 °С, затем в течение ночи при 4 °С. Вирусоносительную аллантаическую жидкость из эмбрионов отбирали в стерильные пробирки и хранили при температуре минус 80 °С. Вирус A/Chicken/NJ/294508-12/2004-CI (H7N2) депонирован в Государственную коллекцию вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (подразделение Института вирусологии им. Д. И. Ивановского), под № 2889 (GenBank № MN400388–MN400395).

Адаптация вируса к размножению в легких мышей. Для получения адаптированного к репродукции вируса в легких белых беспородных мышей животных заражали интраназально вирусоносительной аллантаической жидкостью. Через 48 ч часть мышей была усыплена в атмосфере CO₂, другая часть — оставлена на выживание. Легкие усыпленных мышей гомогенизировали в 3 мл среды гидролизата лактальбумина без глутамина (ООО «Компания «ПанЭко», Россия) до образования однородной массы. Легочную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 835 г, супернатант использовали для следующего интраназального заражения мышей, а также для постановки реакции гемагглютинации с целью определения титра вируса в легких. После серии из 11 пассажей проводили клонирование вируса в куриных эмбрионах методом предельных разведений для получения однородной вирусной популяции.

Реакция гемагглютинации (РГА). Полученный вирус гриппа титровали в РГА. В лунках круглодонного планшета к серии двукратных разведений вируса гриппа в буферном растворе (0,15 М NaCl, 0,01 М Tris-HCl, pH 7,2) добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов. Смесь вируса гриппа и эритроцитов инкубировали при 4 °С в течение 20–30 мин. Титром вируса считали обратную величину последнего разведения, агглютинирующего эритроциты, и выражали его в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ) [11].

Определение 50% эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД₅₀) вируса гриппа А на куриных эмбрионах. Для определения ЭИД₅₀ 10-суточные куриные эмбрионы заражали в ал-

лантаическую полость 10-кратными серийными разведениями вируса по 8 эмбрионов на разведение. После заражения вирусом куриные эмбрионы инкубировали 48 ч при 37 °С, затем в течение ночи при 4 °С. К аллантаической жидкости, собранной из каждого эмбриона, добавляли 1% суспензию куриных эритроцитов и оценивали гемагглютинацию как показатель присутствия вируса гриппа в пробе. Среднее значение ЭИД₅₀/мл вычисляли, пользуясь методом Рида и Менча [12].

Определение 50% летальной дозы (ЛД₅₀) вируса гриппа А для мышей. Для определения 50% летальной дозы (ЛД₅₀/мл) мышей линии BALB/c заражали интраназально под легким эфирным наркозом 50 мкл вируса, разведенного в 9, 27 и 81 раз (по 6 животных в каждой группе). В течение 14 сут оценивали изменение массы тела и выживаемость животных. Значение ЛД₅₀/мл вычисляли, используя метод Кербера в редакции Ашмарина [13].

Генетический анализ вирусов (полногеномное секвенирование) проводили согласно методике, описанной в [14]. Библиотека для секвенирования на платформе Illumina была приготовлена с помощью Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, США). Секвенирование было выполнено на платформе MiSeq (Illumina, США) с помощью реагента Kit v3 (600 циклов). Данные секвенирования были собраны *de novo* в программе CLC Genomics Workbench 8.5.1 s.

Получение рекомбинантного аденовируса. Рекомбинантный аденовирус Ad5-tet-M2NP, экспрессирующий гены консервативных антигенов вируса гриппа А ионного канала М2 и нуклеопротеина NP, был получен, как описано И. Б. Ермагамбетовым с соавт. [8]. В геном рекомбинантного аденовируса Ad5-tet-M2NP была введена генетическая конструкция, содержащая гены, кодирующие консенсусные между различными субтипамии вируса гриппа А белки М2 и NP.

Иммунизация животных. Мыши были разделены на группы (по 22 особи в группе) и иммунизированы однократно интраназально Ad5-tet-M2NP в дозе 10⁸ БОЕ/мышь. Контрольной группе вводили фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7,4).

Иммуноферментный анализ (ИФА). Через 28 сут после иммунизации у шести мышей из каждой группы отбирали образцы крови для дальнейшего получения сыворотки и определения титра IgG к вирусу гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) методом непрямого ИФА. Сыворотки прогревали при 56 °С в течение 30 мин для инактивации белков комплемента. В качестве антигена использовали сконцентрированный в сахарозе вирус гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). Сорбционную дозу антигена определяли способом «шахматного титрования» в реакции с контрольными сыворотками [15]. В реакции использовали антивидовые антитела к мышинным IgG, конъюгированные с пероксидазой (Merck, Германия), и ТМВ-индикаторную смесь. Оптическую плотность окрашенного продукта измеряли на планшетном фотометре iEMS Rider MF (Thermo LabSystem, США) при длине волны 450 нм.

Заражение животных. Через 21 сут после иммунизации мышам под легким эфирным наркозом интраназально вводили 5 ЛД₅₀ вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) в объеме 50 мкл. Выживаемость и изменение массы тела мышей оценивали в течение 14 сут после заражения.

Определение титра вируса гриппа А в легких мышей. Через 3 и 6 сут после заражения гриппом А по три особи из каждой группы животных были усыплены в атмосфере CO₂, у них были извлечены легкие, из которых были получены гомоген-

⁴ ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (Переиздание).

наты согласно протоколу Viruses Case Study для FastPrep-24™ (MP Biomedical, США). После центрифугирования гомогенатов в течение 1 мин при 10000 g полученный супернатант использовали для получения десятикратных разведений, которыми заражали клетки MDCK (Madin-Darby Canine Kidney cells), Коллекция клеточных культур лаборатории культур тканей (подразделение Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России). Заражение проводили в бессывороточной среде DMEM с добавлением трипсина в концентрации 1 мкг/мл. Через 2 сут отбирали клеточную среду и оценивали в ней присутствие вируса в реакции агглютинации [11]. Инфекционную активность вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [12]. За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную РГА, и выражали в логарифмах 50% тканевой цитопатической дозы вируса (lg TC₅₀).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов ИФА проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (to-way analysis of variance, ANOVA), значений титров антител — с помощью двухстороннего *t*-критерия Стьюдента. Статистическую обработку выживаемости животных проводили с помощью критерия Гехана–Бреслоу–Вилкоксона. Расчеты были выполнены с использованием приложения GraphPad Prism 5.

Результаты и обсуждение

Получение вируса гриппа птиц субтипа H7, адаптированного для размножения в легких мышей. Для адаптации вируса гриппа птиц A/Chicken/NJ/294598-12/2004-CI (H7N2) к размножению в легочной ткани мышей было проведено его многократное пассирование в легких лабораторных мышей. После клонирования в куриных эмбрионах полученный адаптированный вариант вируса был обозначен как A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) и депонирован в Государственную коллекцию вирусов (подразделение Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России) под № 2890. Было проведено полногеномное секвенирование, и полученные сиквенсы были депонированы в GenBank под № MN400380–MN400387.

Полученный вирус гриппа птиц субтипа H7 был протитрован в РГА, гемагглютинирующий титр вируса составил 512 ГАЕ. Инфекционность вируса определяли на куриных эмбрионах, ЭИД₅₀/мл составила 5,62×10¹⁰.

Определение 50% летальной дозы для вируса гриппа птиц субтипа H7, адаптированного для размножения в легких мышей. Определение ЛД₅₀ вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) для лабораторных мышей проводили путем введения животным вируса, разведенного в 9, 27 и 81 раз. В течение 14 сут после заражения фиксировали гибель животных и изменение их средней массы тела (табл. 1).

Как видно из данных таблицы 1, адаптированный для размножения в легких мышей вирус способен вызывать заболевание и гибель животных, причем этот эффект является дозозависимым. Титр вируса гриппа ЛД₅₀/мл был рассчитан по методу Кербера в редакции Ашмарина [13] и составил 3,9×10².

Определение уровня антител к вирусу гриппа птиц субтипа H7 в сыворотках крови мышей, иммунизированных аденовирусом Ad5-tet-M2NP. Для определения уровня антител к вирусу гриппа птиц субтипа H7 мышей линии BALB/c иммунизировали аденовирусом Ad5-tet-M2NP интраназально однократно. В качестве контрольной использовалась группа мышей, которым вводили фосфатно-солевой буферный раствор. Полученные через 21 сут после иммунизации сыворотки крови анализировали на наличие специфических IgG-антител к вирусу гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) методом непрямого ИФА (рис. 1).

В сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad5-tet-M2NP, был определен высокий уровень IgG к вирусу гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). При этом средний геометрический титр (СГТ) в группе, иммунизированной Ad5-tet-M2NP, составил 28735 и был достоверно выше, чем в контрольной группе (СГТ < 800, *p* < 0,05). Полученные данные свидетельствуют об индукции гуморального иммунного ответа в организме животного после интраназального введения рекомбинантного аденовируса Ad5-tet-M2NP.

Защита мышей, иммунизированных Ad5-tet-M2NP, от заражения вирусом гриппа птиц субтипа H7. Для изучения защитного действия аденовируса Ad5-tet-M2NP однократно

Таблица 1. Число выживших животных и их средняя масса тела при титровании вируса гриппа птиц субтипа H7
Table 1. The number of animals who survived and their average weight at the time of titration of avian influenza virus, subtype H7

Разведение, раз Dilution, times	Показатель Parameter	Оценка гибели и клинического состояния животных на ... сут Death rate and assessment of the animals' clinical condition on day...									
		0	1	2	3	6	8	9	10	13	14
9	Мыши, шт. Mice, number	6	6	6	4	0	0	0	0	0	0
	Средняя масса тела, г Average body weight, g	20,1	20,0	18,6	17,2	-	-	-	-	-	-
27	Мыши, шт. Mice, number	6	6	6	6	5	3	2	1	1	1
	Средняя масса тела, г Average body weight, g	19,5	19,9	18,2	17,6	15,2	14,8	14,8	14,8	16,4	16,9
81	Мыши, шт. Mice, number	6	6	6	6	5	5	5	5	5	5
	Средняя масса тела, г Average body weight, g	19,9	19,8	18,0	17,3	15,6	17	17,2	17,3	18,4	18,5
Контрольная группа Control group	Мыши, шт. Mice, number	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Средняя масса тела, г Average body weight, g	19,9	19,9	20,0	20,0	20,0	19,9	19,8	20,0	19,9	20,0

Примечание. «-» не применимо.
Note. - not applicable.

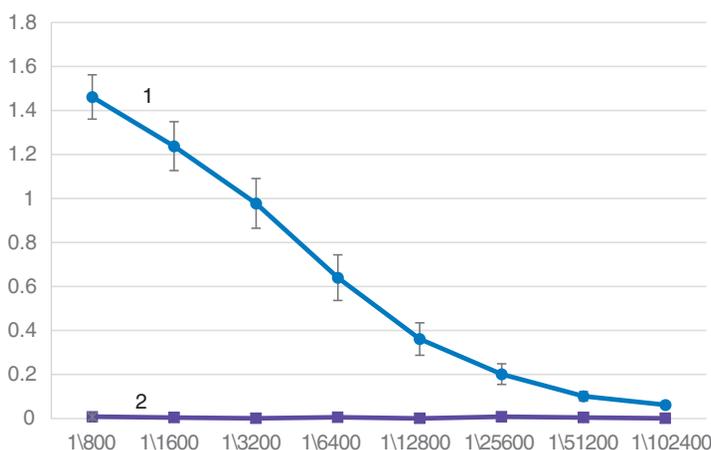


Рис. 1. Уровень антител к вирусу гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) в сыворотках крови мышей, иммунизированных аденовирусом Ad5-tet-M2NP. Ось ординат — оптическая плотность (OD); ось абсцисс — разведение сыворотки. (1) опытная группа; (2) контрольная группа. Значения OD опытной группы достоверно выше контрольной, $p < 0,001$.

Fig. 1. The level of antibodies to influenza virus A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) in the sera of mice immunised with Ad5-tet-M2NP adenovirus. Y axis—optical density (OD); X axis—serum dilution. (1) experimental group; (2) control group. The OD values of the experimental group were significantly higher than those of the control group ($p < 0.001$).

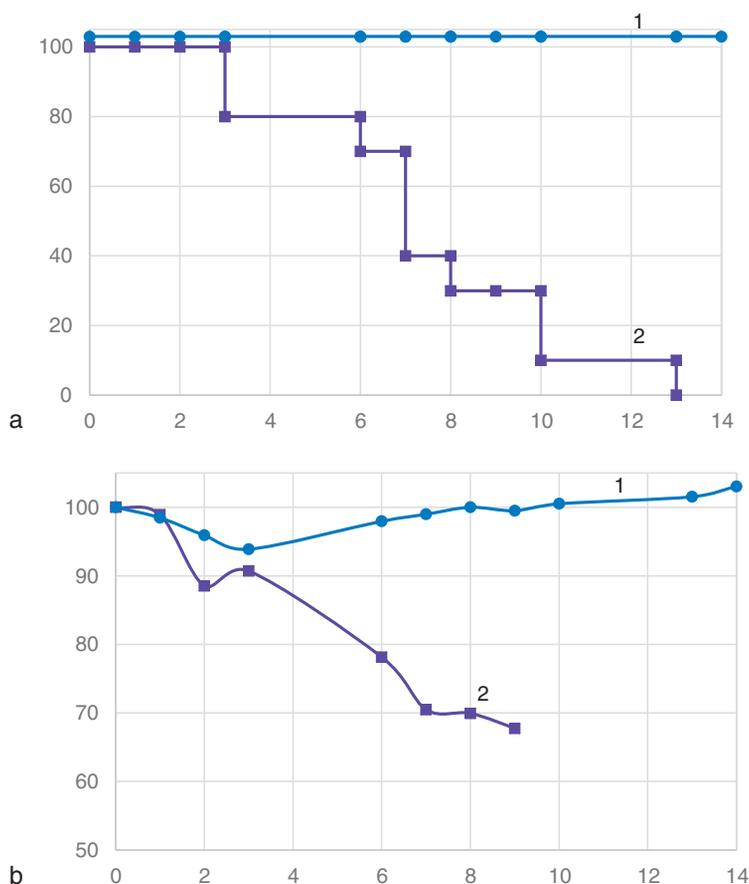


Рис. 2. Защитные свойства иммунизации мышей рекомбинантным аденовирусом Ad5-tet-M2NP от заражения 5 ЛД₅₀ вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). а — динамика выживаемости. Ось ординат — количество выживших животных, %; ось абсцисс — продолжительность, сут. б — динамика снижения массы тела. Ось ординат — изменение массы тела животных, % от исходной; ось абсцисс — продолжительность, сут. (1) опытная группа; (2) контрольная группа. Достоверная разница между выживаемостью в опытной и контрольной группах $p < 0,0001$, между изменением массы тела в опытной и контрольной группах $p < 0,05$.

Fig. 2. Protective effect of mice immunisation with Ad5-tet-M2NP recombinant adenovirus from infection with 5 LD₅₀ of influenza virus A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). a—survival rate. Y axis—the number of animals who survived, %; X axis—time period, days. b—weight loss. Y axis—body weight change, % of the initial weight; X axis—time period, days. (1) experimental group; (2) control group. There were statistically significant differences between the survival rates in the experimental and control groups ($p < 0.0001$) and between weight changes in the experimental and control groups ($p < 0.05$).

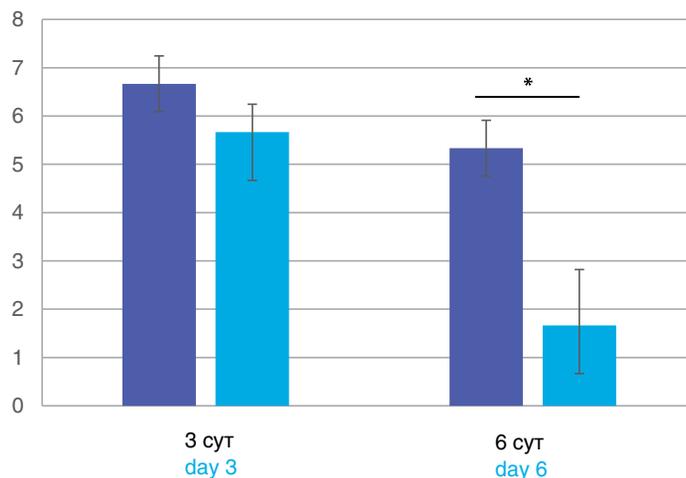


Рис. 3. Титры вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) (среднее значение Ig(TCID₅₀)) в легких мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad5-tet-M2NP, после заражения вирусом гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). (■) контрольная группа; (■) опытная группа. * $p < 0,05$.

Fig. 3. A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) virus titres (mean Ig(TCID₅₀)) in the lungs of mice immunised with Ad5-tet-M2NP, which were determined after infection of the animals with influenza A virus (H7N2). (■) control group; (■) experimental group. * $p < 0.05$.

интраназально иммунизированных животных заражали 5 ЛД₅₀ вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). После заражения вирусом гриппа птиц субтипа H7 мыши, иммунизированные Ad5-tet-M2NP, продемонстрировали 100% выживаемость, однако наблюдалось незначительное снижение массы тела (менее чем на 10%). При этом в контрольной группе наблюдалась гибель 100% мышей в течение 13 сут и снижение массы тела более чем на 30% (рис. 2).

Таким образом, иммунизация рекомбинантным аденовирусом Ad5-tet-M2NP обеспечивает защиту мышей от заражения летальной дозой вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2).

Оценка накопления вируса в легких мышей, иммунизированных Ad5-tet-M2NP, после заражения животных вирусом гриппа птиц субтипа H7. Через 28 сут после иммунизации мышей интраназально под эфирным наркозом заражали вирусами гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) в дозе 5 ЛД₅₀ на животное. Через 3 и 6 сут после заражения животных усыпляли в атмосфере CO₂ и оценивали накопление вируса гриппа в легких животных по величине титра вируса гриппа на культуре клеток MDCK (рис. 3).

Показано, что средний Ig титра вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) на 3 сут после заражения в легких контрольной группы мышей составил 6,67, а на 6 сут — 5,67. При этом средний Ig титра вируса A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) в легких иммунизированных мышей составил на 3 сут 5,33, а на 6 сут — 1,66. Таким образом, на 3 сут после заражения вирусом гриппа птиц субтипа H7 уровни накопления вируса гриппа в легких иммунизированных животных опытной и контрольной групп не имели достоверных различий, тогда как на 6 сут после заражения уровень накопления вируса гриппа в легких мышей опытной группы был достоверно ниже уровня накопления вируса гриппа в легких мышей контрольной группы ($p < 0,05$).

Заключение

В результате проведенной работы был адаптирован к размножению в легких мышей вирус гриппа птиц A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). Геном вируса был секвениро-

ван, вирус был охарактеризован. Гемагглютинирующий титр вируса A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) составил 512 ГАЕ, ЭИД₅₀/мл — $5,62 \times 10^{10}$, ЛД₅₀/мл для лабораторных мышей — $3,9 \times 10^2$. Полученный вирус был использован для оценки защитных свойств рекомбинантного аденовируса человека пятого серотипа Ad5-tet-M2NP, экспрессирующего гены антигенов вируса гриппа А ионного канала М2 и нуклеопротеина NP.

Показано, что рекомбинантный аденовирус Ad5-tet-M2NP при иммунизации лабораторных мышей способен вызывать формирование гуморального иммунного ответа к вирусу гриппа птиц субтипа H7, а также обеспечивать защиту от гибели при заражении летальной дозой (5 ЛД₅₀) вируса гриппа птиц субтипа H7. Иммунизация не защищала животных от проявления симптомов заболевания (снижение массы тела), однако по сравнению с контрольной группой они проявлялись существенно менее выражено. Иммунизация обеспечивала 100% выживаемость животных после заражения летальной дозой (5 ЛД₅₀) вируса гриппа птиц субтипа H7. Оценка накопления вируса гриппа в легких иммунизированных и не иммунизированных животных на культуре клеток MDCK показала, что в легких мышей из группы, иммунизированной Ad5-tet-M2NP, как и в легких мышей из контрольной группы, на 3 сутки после заражения наблюдался высокий уровень накопления вируса гриппа птиц субтипа H7 (титр 6,67 Ig(TCID₅₀)) для контрольной группы и 5,33 Ig(TCID₅₀)) для опытной). Однако уже к 6 суткам произошло существенное снижение уровня вируса гриппа птиц субтипа H7 в легких иммунизированных мышей (до титра 1,66 Ig(TCID₅₀)) по сравнению с контрольной группой (титр 5,67 Ig(TCID₅₀)).

Рекомбинантный аденовирус Ad5-tet-M2NP может быть использован для создания потенциальной пандемической противогриппозной вакцины широкого спектра действия, в том числе и от вирусов гриппа птиц субтипа H7. Подобная вакцина может обеспечить протекание заболевания в легкой форме, а уменьшение вирусывыделения из легких снизит скорость распространения инфекции среди населения. Применение вакцины широкого спектра действия позволит существенно снизить уровень заболеваемости, смертности и уменьшить экономические затраты во время возможной пандемии.

Вклад авторов. **Е. С. Седова** — сбор и интерпретация результатов работы, статистическая обработка данных, написание текста; **Л. В. Верховская** — сбор и систематизация данных, оценка уровня антител в сыворотках крови мышей методом ИФА; **Э. А. Артемова** — проведение иммунизации животных, отбора образцов крови и легких; **Д. Н. Щербинин** — получение рекомбинантного аденовируса, консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ; **А. А. Лысенко** — наращивание рекомбинантного аденовируса в препаративных количествах, доработка текста; **И. А. Руднева** — проведение работ, связанных с адаптацией вируса гриппа птиц к размножению в легких лабораторных мышей и получением его характеристик; **А. В. Ляшко** — проведение работ, связанных с адаптацией вируса гриппа птиц к размножению в легких лабораторных мышей и получением его характеристик; **С. А. Алексеева** — работа с культурой клеток MDCK, интерпретация результатов исследования, доработка текста; **И. Б. Есмагамбетов** — получение рекомбинантного аденовируса; **Т. А. Тимофеева** — проведение работ, связанных с адаптацией вируса гриппа птиц к размножению в легких лабораторных мышей и получением его характеристик, планирование исследования, консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ, интерпретация результатов исследования; **М. М. Шмаров** — идея, концепция и дизайн исследования, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. **Elena S. Sedova**—data collection, interpretation of research results, writing the text; **Lyudmila V. Verkhovskaya**—data collection and systematisation, determination of the antibody level in the mice blood serum by ELISA; **Elina A. Artemova**—immunisation of animals, sampling of blood and lungs; **Dmitry N. Shcherbinin**—production of the recombinant adenovirus, consultation on the implementation of individual stages of experimental work; **Andrey A. Lysenko**—propagation of the recombinant adenovirus in preparative quantities, revising the text; **Irina A. Rudneva**—adaptation of avian influenza virus for reproduction in the lungs of laboratory mice and its characterisation; **Aleksandr V. Lyashko**—adaptation of avian influenza virus for reproduction in the lungs of laboratory mice and its characterisation; **Svetlana A. Alekseeva**—work with MDCK cell culture, interpretation of research results, revising the text; **Ilias B. Esmagambetov**—production of the recombinant adenovirus; **Tatyana A. Timofeeva**—adaptation of avian influenza virus for reproduction in the lungs of laboratory mice and its characterisation, research planning, consultation on the implementation of individual stages of experimental work, interpretation of research results; **Maksim M. Shmarov**—idea, research concept and design, approval of the final version for publication.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки. Коллектив авторов выражает благодарность доктору биологических наук А. С. Гамбарян, руководителю лаборатории молекулярной биологии вирусов гриппа ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» за любезно предоставленный штамм вируса гриппа птиц A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2).

Acknowledgements. The study was performed without external funding. The authors are grateful to A. S. Gambaryan, Head of the Laboratory of Molecular Biology of Influenza Viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Products of the Russian Academy of Sciences for providing avian influenza virus A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2).

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

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

Литература/References

1. Pavia A. One hundred years after the 1918 pandemic: new concepts for preparing for influenza pandemics. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32(4):365–71. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000564>
2. Monto AS, Fukuda K. Lessons from influenza pandemics of the last 100 years. *Clin Infect Dis.* 2019;pii:ciz803. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz803>
3. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Blish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science.* 2009;325(5937):197–201. <https://doi.org/10.1126/science.1176225>
4. Sutton TC. The pandemic threat of emerging H5 and H7 avian influenza viruses. *Viruses.* 2018;10(9):pii:E461. <https://doi.org/10.3390/v10090461>
5. Ertl HC. Viral vectors as vaccine carriers. *Curr Opin Virol.* 2016;21:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.06.001>
6. Шмаров ММ, Седова ЕС, Верховская ЛВ, Руднева ИА, Богачева ЕА, Барыкова ЮА и др. Индукция протективного гетеросубтипического иммунного ответа против вируса гриппа при иммунизации рекомбинантными аденовирусными векторами, экспрессирующими гемагглютинин вируса гриппа H5. *Acta Naturae.* 2010;2(1):119–26. [Shmarov MM, Sedova ES, Verkhovskaya LV, Rudneva IA, Bogacheva EA, Barykova YuA, et al. Induction of a protective heterosubtypic immune response against the influenza virus by using recombinant adenoviral vectors expressing hemagglutinin of the influenza H5 virus. *Acta Naturae.* 2010;2(1):111–8] <https://doi.org/10.32607/20758251-2010-2-1-111-118>
7. Zhang C, Zhou D. Adenoviral vector-based strategies against infectious disease and cancer. *Hum Vaccin Immunother.* 2016;12(8):2064–74. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1165908>
8. Есмагамбетов ИБ, Седова ЕС, Щербинин ДН, Лысенко АА, Гарас МН, Шмаров ММ, Логунов ДЮ. Конструирование рекомбинантного аденовируса человека, экспрессирующего гены консервативных антигенов вируса гриппа А ионного канала М2 и нуклеопротеина. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2014;(2):22–8. [Esmagambetov IB, Sedova ES, Shcherbinin DN, Lysenko AA, Garas MN, Shmarov MM, Logunov DY. Construction of recombinant adenoviral vector expressing genes of the conservative influenza proteins M2 and nucleoprotein. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2014;(2):22–8 (In Russ.)]
9. Tutykhina I, Esmagambetov I, Bagaev A, Pichugin A, Lysenko A, Shcherbinin D, et al. Vaccination potential of B and T epitope-enriched NP and M2 against Influenza A viruses from different clades and hosts. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191574>
10. Рыбакова АВ, Макарова МН. Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской Директивой 2010/63. *Международный вестник ветеринарии.* 2015;(2):96–107. [Rybakova AV, Makarova MN. Methods of euthanasia of laboratory animals, in accordance with European Directive 2010/63. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine.* 2015;(2):96–107 (In Russ.)]
11. Шубладзе АК, Гайдамович СЯ. *Краткий курс практической вирусологии.* 2-е изд. М.: Медгиз; 1954. [Shublazde AK, Gaydamovich SYa. *A short course of practical virology.* 2nd ed. Moscow: Medgiz; 1954 (In Russ.)]
12. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology.* 1938;27(3):493–7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
13. Ашмарин ИП. Вычисление ЕД50 при малом числе подопытных животных. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 1959;30(2):102–8. [Ashma-

- rin IP. Calculation of ED50 in a small number of experimental animals. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology*. 1959;30(2):102–8 (In Russ.)]
14. Voronina OL, Ryzhova NN, Aksenova EI, Kunda MS, Sharapova NE, Fedyakina IT, et al. Genetic features of highly pathogenic avian influenza viruses A(H5N8), isolated from the European part of the Russian Federation. *Infect Genet Evol*. 2018;63:144–50. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.022>
15. Crowther JR. Titration of reagents. In: Crowther JR. *The ELISA Guidebook*. Methods in Molecular Biology, vol. 149. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2001. P. 83–113. <https://doi.org/10.1385/1592590497>

Об авторах / Authors

Седова Елена Сергеевна, канд. биол. наук. *Elena S. Sedova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>
Верховская Людмила Викторовна, канд. биол. наук. *Lyudmila V. Verkhovskaya*, Cand. Sci. (Biol.). **SPIN-код РИНЦ:** 5529-5909, **ResearcherID:** F-8268-2014

Артемова Элина Алексеевна. *Elina A. Artemova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7081-0311>

Щербинин Дмитрий Николаевич, канд. биол. наук. *Dmitry N. Shcherbinin*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Лысенко Андрей Александрович, канд. биол. наук. *Andrey A. Lysenko*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-0230-1822>

Руднева Ирина Александровна, канд. биол. наук. *Irina A. Rudneva*, Cand. Sci. (Biol.)

Ляшко Александр Викторович. *Aleksandr V. Lyaschko*

Алексеева Светлана Викторовна, канд. биол. наук. *Svetlana V. Alekseeva*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7435-2891>

Есмагамбетов Ильяс Булатович, канд. биол. наук. *Ilias B. Esmagambetov*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

Тимофеева Татьяна Анатольевна, канд. биол. наук. *Tatyana A. Timofeeva*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Шмаров Максим Михайлович, д-р биол. наук. *Maksim M. Shmarov*, Dr. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

Статья поступила 08.11.2019
После доработки 03.02.2020
Принята к печати 14.02.2020

Article was received 8 November 2019
Revised 3 February 2020
Accepted 14 February 2020

Особенности методического подхода к определению специфической активности интерферона альфа типа

М. Л. Байкова, И. М. Щербаченко*, Л. А. Гайдерова, О. В. Устинникова, А. А. Мовсесянц

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

Для препаратов интерферона альфа типа (ИФН) одним из наиболее значимых показателей, характеризующих их фармацевтическое качество и фармакологическую эффективность, является специфическая противовирусная активность. Для определения специфической активности используют биологический метод количественного определения противовирусной активности на культуре клеток. **Цель работы:** выбор наиболее оптимальных условий проведения анализа по определению специфической активности препаратов ИФН *in vitro*. **Материалы и методы:** количественное определение специфической противовирусной активности проводили с использованием культур клеток гомологичного и гетерологичного происхождения: Vero; MDBK; Hep-2; A-549 и вирусов: везикулярного стоматита (VSV), штамм Индиана, и энцефаломиокардита мышей (EMC) в дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл. В качестве образцов ИФН использовали международный стандарт активности рекомбинантного интерферона альфа-2b (Interferon alpha 2b, human, rDNA, *E. coli*-derived 2nd WHO International Standard 1999 NIBSC, code № 95/566) и интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция-раствор (серия 040214, ООО «Фармапарк», Россия). **Результаты:** анализ полученных данных позволил определить наиболее чувствительные к действию ИФН комбинации клеточных линий и индикаторного вируса, оптимальную концентрацию эмбриональной сыворотки в среде и временные параметры, предпочтительный способ учета результатов испытания. **Выводы:** выбраны оптимальные условия проведения анализа по определению специфической активности препаратов ИФН — наиболее чувствительными к интерферону альфа являются комбинации клеточная культура/вирус: клетки MDBK/вирус VSV и клетки Hep-2/вирус EMC; время инкубирования интерферона с клеточной культурой — 24 ч; концентрация эмбриональной телячьей сыворотки в питательной среде, используемой для разведений препаратов интерферона, — 2–5%. При учете результатов исследования противовирусной активности интерферона более предпочтительным является инструментальный способ как более современный, объективный, точный и менее трудоемкий.

Ключевые слова: интерферон альфа; оценка качества; биологический метод; специфическая противовирусная активность

Для цитирования: Байкова МЛ, Щербаченко ИМ, Гайдерова ЛА, Устинникова ОВ, Мовсесянц АА. Особенности методического подхода к определению специфической активности интерферона альфа типа. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(1):68–73. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-68-73>

***Контактное лицо:** Щербаченко Ирина Михайловна; Sherbachenko@expmed.ru

Aspects of a Methodological Approach to Determination of Interferon Alpha Specific Activity

M. L. Baykova, I. M. Shcherbachenko*, L. A. Gayderova, O. V. Ustinnikova, A. A. Movsesyants

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

Specific antiviral activity is one of the key indicators characterising pharmaceutical quality and pharmacological efficacy of interferon alpha products (IFN- α). Specific activity is determined using a bioassay measuring antiviral activity in cell culture. **The aim of the study** was to select the most appropriate conditions for *in vitro* determination of IFN- α product specific activity. **Materials and methods:** Vero, MDBK, Hep-2, and A-549 homologous and heterologous cell cultures, as well as vesicular stomatitis Indiana virus (VSV) and murine encephalomyocarditis (EMC) virus at a dose of 100 TCD₅₀/0.1 mL were used for determination of specific antiviral activity. The international reference standard of recombinant interferon alpha-2b activity (Interferon alpha 2b, human, rDNA, *E. coli*-derived, 2nd WHO International Standard, 1999, NIBSC Code No. 95/566) and human recombinant interferon alpha 2b in the form of solution (batch No. 040214, Pharmapark LLC, Russia) were used as IFN- α samples. **Results:** the analysis of the obtained data helped to determine: the combinations of cell lines and the indicator virus most sensitive to IFN- α ; the optimal concentration of fetal serum in the medium, and the optimal time parameters; the preferred method of reporting test results. **Conclusions:** the following test conditions were found to be optimal: the MDBK/VSV and Hep-2/EMC combinations proved to be the most sensitive to IFN- α ; the optimal period of interferon and cell culture incubation—24 hours; the optimal concentration of fetal bovine serum in the culture

medium used for diluting interferon products—2–5%. The instrumental procedure is preferred for reporting the results of interferon antiviral activity determination, because it is up-to-date, reliable, accurate and time-efficient.

Key words: interferon alpha (IFN- α); quality control; bioassay; specific antiviral activity

For citation: Baykova ML, Shcherbachenko IM, Gayderova LA, Ustinnikova OB, Movsesyants AA. Aspects of a methodological approach to determination of interferon alpha specific activity. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostics, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(1):68–73. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-68-73>

***Corresponding author:** Irina M. Shcherbachenko; Shcherbachenko@expmed.ru

Лекарственные препараты, активным компонентом которых является интерферон альфа типа (ИФН), широко представлены на современном фармацевтическом рынке и используются в медицинской практике для лечения вирусных, онкологических и инфекционно-воспалительных заболеваний [1–5]. Согласно информации Государственного реестра лекарственных средств¹ в России зарегистрировано около 50 различных препаратов, активным веществом которых является интерферон, порядка 20% из них составляют лекарственные средства зарубежных производителей.

По технологии получения препараты ИФН делятся на природные (ИФН первого поколения) и рекомбинантные (ИФН второго поколения).

Природные интерфероны получают путем воздействия на лейкоциты здоровых доноров вирусами — индукторами интерферона. Рекомбинантные интерфероны продуцируются охарактеризованными культурами клеток (бактерий, дрожжей, млекопитающих), в генетический аппарат которых встроены ген, кодирующий синтез определенного вида интерферона человека².

Появление технологии получения рекомбинантных интерферонов привело к сокращению производства природных препаратов. Это связано в первую очередь с дефицитом и высокой ценностью используемого сырья (донорская кровь). Кроме того, препараты лейкоцитарного происхождения, как и любые другие препараты крови, потенциально небезопасны с точки зрения контаминации. Таким образом, в настоящее время в клинической практике используют в основном рекомбинантные интерфероны, что определяет необходимость совершенствования их производства и оценки качества [6, 7].

Общие требования к оценке качества препаратов ИФН сформулированы в ОФС 1.7.1.0012.18 Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ)³. Основными показателями качества, гарантирующими эффективность и безопасность лекарственных средств на основе рекомбинантных ИФН, являются: подлинность, количественное определение специфической противовирусной активности, количественное определение целевого белка, анализ чистоты и идентификация примесей [8].

Наиболее значимой характеристикой эффективности лекарственных средств, содержащих ИФН, является их специфическая активность. От точности определения данного показателя в конечном итоге зависит успешное клиническое использование препарата [9, 10]. Для определения специфической активности используют биологический метод количественного определения противовирусной активности на культуре клеток. Проявление специфической противовирусной активности служит также подтверждением подлинности препарата. Описание данного метода в Государственной фармакопее Российской Федерации и в Европейской фармакопее⁴

содержит общие принципы проведения исследования и носит рекомендательный характер. В связи с этим разные производители используют различные модификации метода и разные способы учета результатов определения специфической противовирусной активности.

Цель работы — установить оптимальные условия проведения анализа по определению специфической активности препаратов интерферона альфа типа *in vitro*.

Задачи исследования:

- сравнительное изучение чувствительности различных клеточных линий к действию интерферона и индикаторного вируса;
- выбор временных параметров и концентрации эмбриональной сыворотки в питательной среде;
- сравнительный анализ различных способов учета результатов испытания.

Материалы и методы

Материалы:

- набор реагентов «Питательная среда DMEM для культур клеток в комплексе с L-глутамином», Россия; гентамицин, раствор для внутривенного и внутримышечного введения 40 мг/мл, Беларусь;
- сыворотка Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich Co, США;
- кристаллический фиолетовый, Merck, Германия;
- международный стандарт активности рекомбинантного интерферона альфа-2b (Interferon alpha 2b, human, rDNA, *E. coli*-derived 2nd WHO International Standard 1999 NIBSC, code № 95/566) (МСО ИФН альфа-2b);
- интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция-раствор (серия 040214, ООО «Фармапарк», Россия);
- линии культур клеток гомологичного и гетерологичного происхождения: Vero — перевиваемая культура клеток почек африканской зеленой марышки; MDBK — перевиваемая культура почек крупного рогатого скота; Hep-2 — перевиваемая линия эпидермоидной карциномы гортани человека; A-549 — перевиваемая линия карциномы легкого человека из коллекции ФГУП «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского», ООО «БиолоТ», Россия;
- вирус везикулярного стоматита (VSV), штамм Индиана, из Государственной коллекции вирусов ФГУП «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» № 29 в дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл;
- вирус энцефаломиокардита мышей (ЕМС) (ТС адаптированного) в дозе 100ТЦД₅₀/0,1 мл из коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России.

Оборудование:

- CO₂-инкубатор JOUAN IG 150;
- шкаф ламинарный БАВп-01-1,2;

¹ <https://grls.rosminzdrav.ru>

² Ершов ФИ, Киселев ОИ. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005.

³ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0012.18 Интерфероны. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ 5.6. Assay of interferons. *European Pharmacopoeia* 9.2; 2016.

- камера Горяева для счета форменных элементов крови (ООО «МиниМедПром», Россия);
- микроскоп инвертированный ID-03 Opton Feintechnik;
- анализатор фотометрический микропланшетный, Bio-Rad, Венгрия.

Методы

Определение специфической активности основано на способности интерферона подавлять цитопатическое действие индикаторного вируса в культуре клеток. Описание методики приведено в ГФ РФ⁵.

Определение специфической активности препаратов интерферона проводили на монослой культур клеток, полученном при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5)\%$ CO_2 в лунках 96-луночных плоскодонных культуральных планшетов.

Готовили серию разведений испытуемого препарата (ИП) и МСО на 4 разведения выше и ниже предполагаемого титра активности. За титр принимали величину, обратную разведению.

Возможно внесение ИП и МСО в лунки планшета до внесения культуры клеток. В этом случае клеточный монослой будет формироваться с внесенным интерфероном.

Далее планшеты с культурой клеток и внесенными в них разведениями ИП и МСО инкубировали в течение 24–48 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5)\%$ CO_2 . Затем в каждую лунку с ИП и соответствующим МСО вносили вирусную суспензию, содержащую рассчитанную заранее дозу индикаторного вируса $100 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$.

Для контроля дозы индикаторного вируса оставляли 16 лунок с культурой клеток, а для контроля состояния монослоя клеток — 4 лунки. В эти 20 лунок вносили поддерживающую среду.

После внесения индикаторного вируса 96-луночный планшет инкубировали в течение 24–48 ч в стандартных условиях. Инкубацию прекращали при появлении цитопатического действия в монослое клеток с индикаторным вирусом в дозе $1 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$.

Результаты испытания подлежали учету, если выполнялись следующие условия:

- отсутствует дегенерация клеточного монослоя в лунках с контролем клеток и в лунках индикаторного вируса с $0,1 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$;
- доза внесенного вируса составляет $100 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$.

Учет активности интерферона осуществляли визуально или инструментально.

Визуальный учет активности интерферона производили микроскопически при 100-кратном увеличении через 24–48 ч после внесения индикаторного вируса. За титр интерферона принимали величину, обратную разведению препарата, при котором клеточная культура в 50% лунок полностью защищена от цитопатического действия вируса.

Титр интерферона вычисляли методом Спирмена—Кербе-ра по формуле (1):

$$\log_2 ED_{50} = D_{\max} + \frac{d}{n} \left(p - \frac{n}{2} \right)^2, \quad (1)$$

где D_{\max} — двоичный логарифм разведения, ниже значения которого произошла 100% защита;

d — двоичный логарифм интервала между разведениями (равен 1,0);

n — число лунок на каждую дозу (равно 4);

p — число лунок, в которых была обеспечена защита в разведении, ниже значения которого произошла 100% защита, и последующих разведениях.

Противовирусную активность интерферона (A_x) в исследуемом образце в МЕ вычисляли по формуле (2):

$$A_x = \frac{A_{\text{МСО}}}{a_{\text{МСО}}} a_x, \quad (2)$$

где $A_{\text{МСО}}$ — противовирусная активность МСО интерферона в МЕ;
 a_x — титр ИП;
 $a_{\text{МСО}}$ — титр МСО.

Возможен также инструментальный способ учета результатов с использованием селективного окрашивания живых клеток, защищенных интерфероном от действия вируса, элюирования красителя, фотометрирования оптической плотности элюата и последующей компьютерной обработки результатов.

Результаты исследования снижения цитопатического эффекта в основном соответствовали сигмоидальной графики «доза–ответ», когда функция представлена графически — концентрация интерферона (логарифм обратной величины разведения интерферона) к поглощению красителя. Строили график функции концентрации интерферона (логарифм обратной величины разведения) к поглощению красителя для стандартных и исследуемых образцов. Используя линейный участок графика, рассчитывали концентрацию интерферона в образце путем сравнения реакций для растворов стандартного и исследуемого образцов, применяя обычные статистические методы параллельного анализа⁶.

Статистическую обработку проводили общепринятыми методами, применимыми для нормального распределения результатов [11].

Результаты и обсуждение

Важнейшим условием эффективности определения специфической противовирусной активности ИФН является выбор наиболее чувствительной к действию интерферона комбинации клеточной культуры и индикаторного вируса [6, 7]. Для проведения сравнительного изучения чувствительности нескольких клеточных линий к действию интерферона и индикаторного вируса в работе использовали следующие комбинации клеточная культура/вирус: MDBK/VSV, Vero/VSV, Hep2/VSV, Vero/EMC, Hep-2/EMC. Вирус-индикатор вносили в дозе $100 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$. В качестве образца интерферона использовали МСО ИФН альфа-2b. Определяли количество интерферона, при котором клеточная культура в 50% лунок полностью защищена от цитопатического действия вируса в лабораторных единицах (ЛЕ), где лабораторная единица — это величина, обратная разведению интерферона.

Результаты изучения чувствительности исследуемых клеточных линий и индикаторного вируса к действию интерферона альфа представлены на рисунке 1.

⁵ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁶ Там же.

Как показано на рисунке 1, наиболее чувствительными к интерферону альфа оказались следующие комбинации клеточной культуры и вируса:

- клетки MDBK/вирус VSV;
- клетки Hep-2/вирус EMC.

Полученные результаты подтверждают имеющиеся в литературе данные [6–10] и согласуются с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Как известно, активность ИФН зависит от времени его инкубации с клеточной культурой [2, 4, 6, 7]. В работе было изучено влияние времени инкубирования интерферона с культурой клеток на величину проявляемой противовирусной активности (рис. 2). Использовали перевиваемую культуру клеток (MDBK) почек крупного рогатого скота. Концентрация клеток, вносимая в микропланшет, составляла $2,0 \times 10^4$ клеток/0,1 мл. В качестве испытуемого образца использовали МСО ИФН альфа-2b, в качестве индикаторного вируса — вирус везикулярного стоматита (VSV), штамм Индиана.

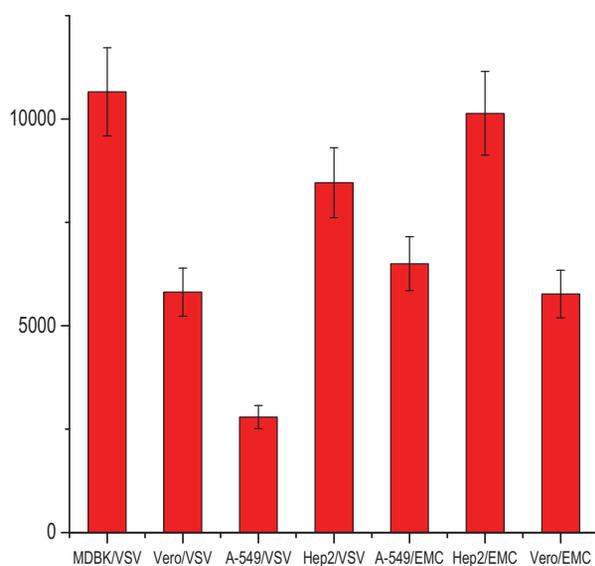


Рис. 1. Чувствительность исследуемых клеточных линий и индикаторного вируса к действию интерферона альфа типа ($n = 10$). Vero — перевиваемая культура клеток почек африканской зеленой марышки; MDBK — перевиваемая культура клеток почек крупного рогатого скота; Hep-2 — перевиваемая линия клеток эпидермоидной карциномы гортани человека; A-549 — перевиваемая линия клеток карциномы легкого человека; VSV — вирус везикулярного стоматита, штамм Индиана, в дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл; EMC — вирус энцефаломиокардита мышей (ТС адаптированного). Вертикальные отрезки (рис. 1–3) — доверительный интервал для среднего значения при нормальном распределении. Ось абсцисс — наименование клеточной линии; ось ординат — противовирусная активность, ЛЕ.

Fig. 1. The sensitivity of the studied cell lines and indicator virus to interferon alpha ($n = 10$). Vero—a continuous cell culture derived from African green monkey kidney; MDBK—a continuous cell culture derived from bovine kidney; Hep-2—a continuous cell line of human laryngeal epidermoid carcinoma cells; A-549—a continuous cell line from human lung carcinoma; VSV—vesicular stomatitis Indiana virus at a dose of 100 TCD₅₀/0.1 mL; EMC—murine encephalomyocarditis (tissue culture adapted). X-axis—cell line; Y-axis—antiviral activity (LSU).

В микропланшеты вносили двукратные разведения МСО ИФН альфа-2b в питательной среде в объеме 0,1 мл и 0,1 мл вирусной суспензии в дозе 100 ТЦД₅₀. Разведения МСО ИФН альфа-2b вносили в лунки планшета как до внесения культуры клеток, так и в сформированный в течение 24 ч монослой клеток. Определяли количество интерферона, при котором клеточная культура в 50% лунок полностью защищена от цитопатического действия вируса. Учет проводили сразу после добавления вируса, через 2 и 24 ч от начала опыта.

Результаты исследования показали, что активность интерферона при минимальной экспозиции, т. е. сразу после внесения интерферона в культуру клеток, в 3 раза ниже, чем при времени экспозиции 24 ч. Полученные результаты подтверждают, что увеличение продолжительности контакта интерферона с клетками увеличивает их резистентность к последующему заражению вирусом. Оптимальная резистентность клеток к вирусу достигается при инкубировании интерферона на культуре клеток в течение 24 ч.

Антисорбционное действие белков эмбриональной телячьей сыворотки на содержащийся в препаратах интерферон хорошо известно. Данный факт необходимо учитывать при разведении интерферона, предусматривая наличие в среде для разведения определенного количества сыворотки⁷.

Было проведено сравнительное изучение зависимости уровня противовирусной активности интерферона от количества эмбриональной телячьей сыворотки в среде титрования.

Испытания проводили на сформированном монослое культуры клеток MDBK с концентрацией $2,0 \times 10^4$ клеток в лунке, в качестве индикаторного вируса использовали вирус везикулярного стоматита, штамм Индиана, в дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл. Результаты исследования представлены на рисунке 3.

В ходе исследования установлено, что активность интерферона при разведении его в среде, не содержащей сыворотку, в два раза ниже, чем в присутствии сыворотки. При этом увеличение содержания сыворотки в питательной среде до 10% не влияет на результаты определения активности интерферона.

Таким образом, оптимальной концентрацией эмбриональной телячьей сыворотки в питательной среде, используемой для разведений препаратов интерферона, можно считать 2–5%.

При сравнительном анализе способов учета результатов испытания использовали перевиваемую культуру клеток MDBK. Концентрация клеток, вносимых в микропланшет, составляла $2,8 \times 10^4$ клеток/0,1 мл. Использовали вирус VSV в дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл. В качестве испытуемого образца использовали интерферон альфа-2b человеческого рекомбинантный, субстанция-раствор в концентрации 3×10^6 ЕД/мл и МСО ИФН альфа-2b в концентрации 550 ЕД/мл.

Учет результатов проводили визуально, затем инструментально. Визуальный учет проводили общепринятым микроскопическим методом⁸. Для инструментального способа учета в качестве красителя использовали 0,5% спиртовой раствор кристаллического фиолетового. Краситель в количестве 50 мкл вносили в лунки культурального планшета, затем при комнатной температуре выдерживали 10 мин, удаляли и промывали лунки очищенной водой до полного исчезновения красителя в смывной воде, просушивали, вносили в качестве элюата 70% раствор этилового спирта

⁷ Ершов ФИ, Киселев ОИ. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005.

⁸ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культуры клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

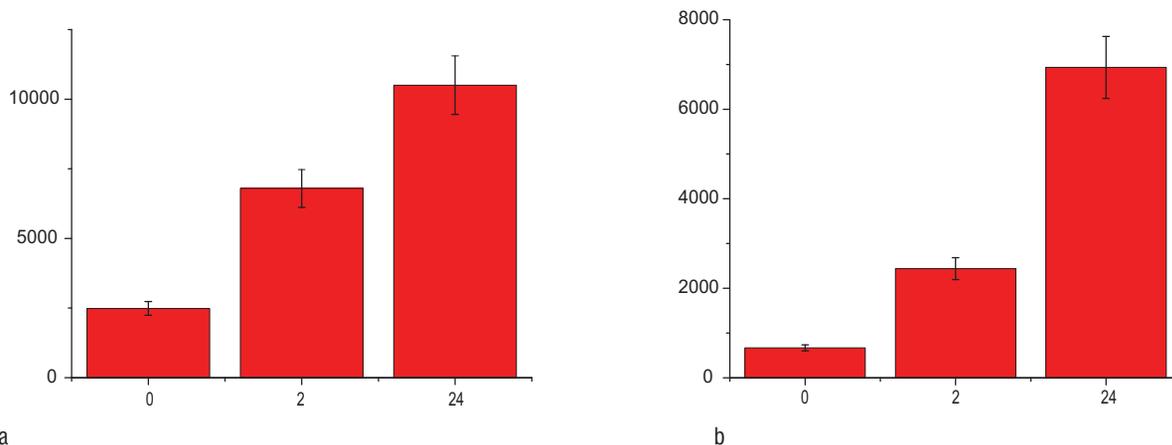


Рис. 2. Влияние времени инкубирования клеточной культуры в присутствии интерферона альфа на результаты определения противовирусной активности ($n = 7$): а — противовирусная активность ИФН-альфа при внесении в сформированный монослой культур клеток; б — противовирусная активность ИФН-альфа при внесении в суспензию культур клеток. Ось абсцисс — время инкубирования, ч; ось ординат — противовирусная активность, ЛЕ.

Fig. 2. The effect of the incubation period of the cell culture with interferon alpha on the results of antiviral activity determination ($n = 7$): а—IFN-alpha antiviral activity upon inoculation into the cell culture monolayer; б—IFN-alpha antiviral activity upon inoculation into the cell culture suspension. X-axis—incubation period, h; Y-axis—antiviral activity, LSU.

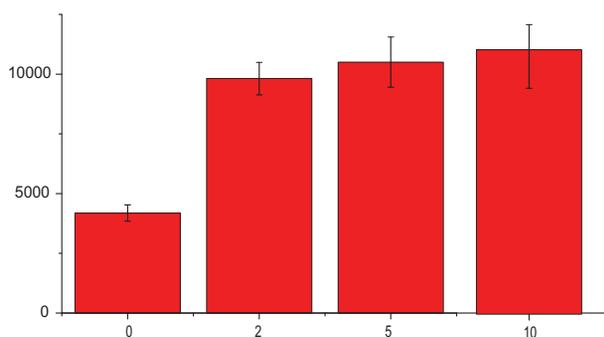


Рис. 3. Влияние состава среды титрования на противовирусную активность интерферона альфа ($n = 7$). Ось абсцисс — концентрация сыворотки в среде, %; ось ординат — противовирусная активность, ЛЕ.

Fig. 3. The effect of the titration medium composition on the antiviral activity of interferon ($n = 7$). X-axis—serum concentration in the medium, %; Y-axis—antiviral activity, LSU.

в количестве 0,1 мл, перемешивали на шейкере в течение 30 мин. Проводили измерение оптической плотности содержимого лунок на фотометрическом микропланшетном анализаторе при длине волны 595 нм. На основании этих данных строили графики зависимости оптической плотности от двоичного логарифма разведений, используя компьютерную программу OringinPro 9.1. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Как показано в таблице 1, значения величин противовирусной активности, полученные при визуальном и инструментальном способах учета результатов, не имеют достоверных различий, но визуальный (микроскопический) способ учета является гораздо более субъективным, требует участия специалиста, имеющего большой опыт работы с микроскопическими методами исследования. Таким образом, более предпочтительным является инструментальный способ учета как более объективный, современный и в конечном счете менее трудоемкий.

Таблица 1. Сравнительная оценка результатов определения противовирусной активности интерферона альфа при визуальном и инструментальном способах учета первичных данных

Table 1. The results of antiviral activity determination using the visual and instrumental methods of primary data reporting

№ п/п No.	Способ учета Reporting method	
	визуальный, МЕ/мл visual, IU/mL	инструментальный*, МЕ/мл instrumental*, IU/mL
1	$5,4 \times 10^8$	$4,9 \times 10^8$
2	$5,4 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$
3	$4,9 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$
4	$5,4 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$
5	$4,9 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$
6	$4,9 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$
7	$4,9 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$
8	$4,2 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$
9	$4,3 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$
10	$4,7 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$

*С помощью программы OringinPro 9.1.

*Using the OringinPro 9.1 software.

Выводы

1. Сравнительное изучение нескольких клеточных линий к действию ИФН и индикаторного вируса выявило, что наиболее чувствительными являются следующие комбинации клеточной культуры/вируса: клетки MDBK/вирус VSV и клетки Нер-2/вирус EMC.

2. Оптимальное время инкубирования интерферона с клеточной культурой — 24 ч. Оптимальная концентрация эмбриональной телячьей сыворотки в питательной среде, используемой для разведений препаратов интерферона, — 2–5%.

3. Значения величин противовирусной активности, полученные при визуальном и инструментальном (микроскопическом) способах учета результатов, не имеют достоверных различий. Однако более предпочтительным является инструментальный способ как более объективный, современный точный и менее трудоемкий.

Вклад авторов. *М. Л. Байкова* — концепция и дизайн исследования, экспериментальная работа; *И. М. Щербаченко* — идея, интерпретация данных, написание текста; *Л. А. Гайдерова* — обобщение экспериментальных данных, доработка текста; *О. Б. Устинникова* — написание и доработка текста; *А. А. Мовсесянц* — окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. *Marina L. Baykova*—research concept and design, experimental work; *Irina M. Shcherbachenko*—idea, interpretation of research results, writing the text; *Lidia A. Gayderova*—integration of experimental data, revising the text; *Olga B. Ustinnikova*—writing, revising the text; *Artashes A. Movsesyants*—final approval of the version to be published.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-0003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-0003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

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

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

Литература/References

1. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:727–77. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.003455>
2. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:227–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.227>
3. Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators — a new look. *Immunity.* 2001;14(6):661–4. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00154-6](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00154-6)
4. Quesada JR, Gutterman JU, Hersh EM. Treatment of hairy cell leukemia with alpha interferons. *Cancer.* 1986;57(8 Suppl):1678–80. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19860415\)57:8+<1678::aid-cnrc2820571308>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19860415)57:8+<1678::aid-cnrc2820571308>3.0.co;2-6)
5. Baron S, Tyring SK, Fleischmann WR Jr, Copenhagen DH, Niesel DW, Klimpel GR, et al. The interferons. Mechanisms of action and clinical applications. *JAMA.* 1991;266(10):1375–83. <https://doi.org/10.1001/jama.266.10.1375>
6. Larocque L, Bliu A, Xu Ranran, Diress A, Wang J, Lin R, et al. Bioactivity determination of native and variant forms of therapeutic interferons. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:174615. <https://doi.org/10.1155/2011/174615>
7. Meager A, Gaines Das R, Zoon K, Mire-Sluis A. Establishment of new and replacement World Health Organization International Biological Standards for human interferon alpha and omega. *J Immunol Methods.* 2001;257(1–2):17–33. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(01\)00460-4](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(01)00460-4)
8. Авдеева ЖИ, Алпатова НА, Солдатов АА, Бондарев ВП, Бунятыян НД, Меркулов ВА и др. Особенности доклинических исследований биотехнологических лекарственных препаратов. *Иммунология.* 2015;36(5):306–12. [Avdeeva ZhI, Alpatova NA, Soldatov AA, Bondarev VP, Bunyatyanyan ND, Merkulov VA, et al. Features of preclinical studies of biotechnological medicines. *Immunologiya = Immunology.* 2015;36(5):306–12 (In Russ.)]
9. Meager A. Assays for antiviral activity. *Methods Mol Biol.* 2004;249:121–34. <https://doi.org/10.1385/1-59259-667-3:121>
10. Алпатова НА, Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Бондарев ВП, Медуницын НВ. Принципы оценки специфической активности биотехнологических лекарственных препаратов. *Цитокины и воспаление.* 2015;14(3):10–8. [Alpatova NA, Avdeeva ZhI, Soldatov AA, Bondarev VP, Medunitsyn NV. Principles of assessment of biotechnological medicines specific activity. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation.* 2015;14(3):10–8 (In Russ.)]
11. Гланц С. *Медико-биологическая статистика.* Пер. с англ. М.: Практика; 1998. [Glanz S. *Biomedical statistics.* Moscow: Praktika; 1998 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Байкова Марина Леонидовна. *Marina L. Baykova.* ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9889-4038>

Щербаченко Ирина Михайловна, канд. биол. наук. *Irina M. Shcherbachenko,* Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9378-3312>

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук. *Lidia A. Gayderova,* Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Устинникова Ольга Борисовна, канд. биол. наук. *Olga B. Ustinnikova,* Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф. *Artashes A. Movsesyants,* Dr Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Поступила 05.09.2019

После доработки 31.10.2019

Принята к публикации 14.02.2020

Received 5 September 2019

Revised 31 October 2019

Accepted 14 February 2020



Жанна Ильдаровна Авдеева (к 80-летию со дня рождения)

Zhanna Ildarovna Avdeeva (on the 80th Anniversary)

13 января 2020 года исполнилось 80 лет доктору медицинских наук, профессору, главному эксперту управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Жанне Ильдаровне Авдеевой.

Уже более 55 лет Жанна Ильдаровна посвятила добросовестному служению здравоохранению России. После окончания Башкирского государственного медицинского института по специальности «Лечебное дело» в 1963 году Жанна Ильдаровна начала свой трудовой путь в должности участкового врача-педиатра Детской объединенной больницы в г. Стерлитамаке. В 1973 году после окончания очной аспирантуры в Московском институте вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова Жанна Ильдаровна успешно защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук на тему «Иммунобиологические свойства цитоплазматической фракции стрептококка группы А» по специальности «Микробиология».

В разные годы Ж. И. Авдеева работала в лаборатории соединительной ткани Института ревматологии АМН СССР, лаборатории молекулярной иммунологии Института иммунологии Минздрава СССР, отделении клинической иммунологии и иммунотерапии ЦНИИ кожно-венерологического института Минздрава СССР.

С 1991 по 2011 год Ж. И. Авдеева работала в ГИСК им. Л. А. Тарасевича, пройдя путь от старшего научного сотрудника, ведущего научного сотрудника группы цитокинов до заведующего лабораторией иммунологии. В 1993 году ей было присвоено ученое звание старшего научного сотрудника. В 1997 году Ж. И. Авдеева защитила диссертацию на соискание ученой степени доктора медицинских наук на тему «Экспрессия продуктов генов гистосовместимости класса II в норме и при патологии» по специальности «Аллергология и иммунология». В 2003 году ей было присвоено ученое звание профессора по специальности «Аллергология и иммунология». Под руководством Ж. И. Авдеевой защищено 6 кандидатских диссертаций.

С апреля 2011 года по настоящее время Ж. И. Авдеева работает в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. За годы работы Жанна Ильдаровна принимала участие в выполнении ряда научных исследований, связанных с решением проблем фундаментальной молекулярной иммунологии и клинической имму-

нологии, с разработкой новых лекарственных средств на основе биологически активных компонентов, в том числе природных и рекомбинантных цитокинов. Экспериментальные и клинические научные исследования Ж. И. Авдеевой посвящены изучению значимости перекрестной реактивности антигенов стрептококка группы А и антигенов соединительной ткани в механизмах патогенеза системных заболеваний соединительной ткани; вопросам регуляции интенсивности формирования иммунного ответа эндогенными иммуномодуляторами; изучению роли антигенов гистосовместимости класса II в развитии иммунного ответа при аутоиммунных и аллергических заболеваниях. Значительный объем проведенных Ж. И. Авдеевой исследований посвящен изучению роли экзогенных цитокинов в развитии адаптивного иммунитета, разработке и совершенствованию методов контроля качества новых лекарственных препаратов на основе биологически активных компонентов, включая препараты цитокинов, моноклональных антител, полученных с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Ж. И. Авдеева внесла существенный вклад в разработку документов ЕАЭС по экспертизе биологических лекарственных препаратов.

Жанна Ильдаровна принимает активное участие в научных и научно-практических конференциях, посвященных вопросам разработки и регулирования обращения лекарственных средств, представляя ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Ж. И. Авдеевой лично и в соавторстве опубликовано более 310 научных работ, в том числе более 15 методических рекомендаций и руководств по экспертизе лекарственных средств, получено 1 авторское свидетельство. Жанна Ильдаровна является членом диссертационного совета при ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Вклад Ж. И. Авдеевой в дело сохранения здоровья населения страны отмечен благодарностью министра здравоохранения Российской Федерации (2000), нагрудным знаком «Отличнику здравоохранения» (2001), медалью «В память 850-летия Москвы» (1997), медалью «За заслуги перед отечественным здравоохранением» (2020).

Искренне поздравляем Жанну Ильдаровну с юбилеем! Желаем крепкого здоровья, успехов в профессиональной деятельности, радости и вдохновения!



Вячеслав Борисович Иванов (к 60-летию со дня рождения)

Vyacheslav Borisovich Ivanov (on the 60th Anniversary)

15 марта 2020 года исполнилось 60 лет доктору медицинских наук, профессору, заместителю начальника управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Вячеславу Борисовичу Иванову.

Вячеслав Борисович родился в 1960 году в г. Магдебурге (ГДР) в семье военнослужащего. В 1983 году с отличием окончил факультет подготовки врачей для Военно-воздушных сил Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова по специальности «Лечебно-профилактическое дело». С 1983 по 1986 год В. Б. Иванов проходил службу в должности начальника медицинского пункта, затем начальника медицинской службы отдельной вертолетной эскадрильи.

После окончания адъюнктуры при кафедре военной токсикологии, радиологии и медицинской защиты Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова Вячеслав Борисович был назначен младшим научным сотрудником в Военный институт медицинской техники (Москва).

В 1989 году В. Б. Иванов успешно защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата наук по специальностям «Радиобиология» и «Токсикология», а в 2000 году — диссертацию на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности «Токсикология».

С 1990 года В. Б. Иванов проходил службу на Военно-медицинском факультете при Центральном ордена Ленина институте усовершенствования врачей (с сентября 2015 года — филиал Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова) в должностях преподавателя (1990–1995), старшего преподавателя (1995–1997), доцента (1997–1999), заместителя начальника кафедры (1999–2000), начальника кафедры (2000–2010) военной токсикологии и медицинской защиты.

В 1996 году В. Б. Иванову присвоено ученое звание доцента, а в 2001 году — профессора по кафедре военной токсикологии и медицинской защиты. С 2003 по 2010 год В. Б. Иванов входил в состав двух диссертационных советов и экспертного совета ВАК по медико-биологическим наукам.

Военную службу В. Б. Иванов закончил в августе 2010 года в звании полковника медицинской службы, после чего продолжил работу на кафедре военной токсикологии и медицинской защиты.

С апреля 2011 года по настоящее время В. Б. Иванов работает в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Основными направлениями его деятельности являются экспертиза эффективности и безопасности биологических лекарственных препаратов и проведение научных исследований по обоснованию перспективных направлений совершенствования иммунобиологических лекарственных препаратов.

В. Б. Иванов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

В. Б. Ивановым лично и в соавторстве опубликовано более 200 научных и научно-методических работ в области военной и клинической токсикологии, радиобиологии, клинической фармакологии и информационной медицины, в том числе 35 учебных и учебно-методических пособий, руководств для врачей, 5 монографий. Под руководством В. Б. Иванова подготовлены 1 кандидатская и 2 докторские диссертации.

В. Б. Иванов награжден орденом Почета и 9 медалями Минобороны России.

Поздравляем Вячеслава Борисовича с юбилеем! Желаем творческих успехов, крепкого здоровья, благополучия и оптимизма!



Подписку на журнал
«БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение»
можно оформить в любом почтовом отделении России.

- Подписной индекс в каталоге Агентства «Роспечать»
«Издания органов научно-технической информации» — 57941
- В региональных агентствах подписки
Урал-Пресс (www.ural-press.ru) — 57941
- По объединенному каталогу
«Пресса России» (www.pressa-rf.ru) — Т57941



RegLec – EAЭС

20–22 апреля 2020 г.

Москва, гостиница
«Холидей Инн Москва
Сокольники»

Научно-практическая конференция «СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПЕРТИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ» «РЕГЛЕК – EAЭС 2020»

В конференции примут участие ведущие эксперты и представители регуляторных органов стран EAЭС (Российская Федерация, Республика Беларусь, Республика Казахстан и др.), сотрудники зарубежных и российских фармацевтических компаний производителей и поставщиков лекарственных средств.

Основные темы конференции:

- Особенности организации проведения регуляторных процедур по правилам EAЭС в странах союза. Организация информационного обмена;
- Очистка промышленных линий по производству ЛС и пределы воздействия на здоровье;
- Экспертиза материалов регистрационного досье в части оценки качества по процедурам EAЭС;
- Особая продукция — особая регистрация;
- Инспектирование в EAЭС: кого, когда, зачем и как;
- Место инновационных (гибридных) ЛП в системе регистрации EAЭС;
- Экспертные требования к оценке соотношения ожидаемой пользы к возможным рискам применения препаратов: критический взгляд на анализируемые досье;
- Надлежащая регуляторная практика EAЭС;
- Формирование и использование информации о лекарственных препаратах: что нужно знать фармпроизводителю;
- Актуальные вопросы экспертизы и регистрации лекарственных средств;
- Выпуск в гражданский оборот ЛП: система заработала, есть ли проблемы;
- Актуальное состояние применения правил и требований EAЭС при подаче электронного общего технического документа;
- Различные подходы к маркировке ЛП на этапе технологического процесса;
- Другие актуальные вопросы в сфере экспертизы лекарственных средств.

Программа конференции и заявка на участие на сайте www.fru.ru



ISSN 2221-996X



9 772221 996004