

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, № 4
Октябрь – декабрь 2020



Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment

В НОМЕРЕ

- Анализ перспективных направлений создания вакцин против COVID-19
- Разработка и валидация методики определения концентрации антитела человека, блокирующего связывание PD-1 с лигандами, в сыворотке крови яванского макака методом биослойной интерферометрии

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

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.

Пятилетний импакт-фактор РИНЦ — 0,520.

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, № 4
Октябрь — декабрь 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. 4
October — December 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» ФМБА 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)

Игнатьев 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)

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

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

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. Kutyrev, 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 (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

- Анализ перспективных направлений создания вакцин против COVID-19**
Г. Г. Онищенко, Т. Е. Сизикова, В. Н. Лебедев, С. В. Борисевич 216
- Международные и отечественные нормативные рекомендации к разработке и регистрации вакцин против COVID-19 в условиях пандемии**
А. А. Солдатов, Ж. И. Авдеева, В. П. Бондарев, В. А. Меркулов, В. Д. Мосягин, В. Б. Иванов,
Д. В. Горенков, Л. М. Хантимирова 228
- Общая характеристика адъювантов и механизм их действия (часть 1)**
Н. А. Алпатова, Ж. И. Авдеева, С. Л. Лысикова, О. В. Головинская, Л. А. Гайдерова 245

Оригинальные статьи

- Разработка и валидация методики определения концентрации антитела человека, блокирующего связывание PD-1 с лигандами, в сыворотке крови яванского макака методом биослойной интерферометрии**
К. В. Ульянова, А. А. Казаров, М. С. Пантюшенко, А. А. Оленев, И. В. Лягоскин, В. М. Симонов 257
- Исследование гемостимулирующих свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека**
Г. Г. Шимилина, А. В. Батенева, С. Г. Гамалей, Т. И. Есина, Т. Г. Терещенко, Е. Д. Даниленко 268
- Теоретическое и экспериментальное обоснование перспективных методов экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой**
И. В. Касина, С. А. Алексеева, Т. И. Немировская 277

Хроника

- Научно-практическая конференция «Современные подходы к экспертизе лекарственных средств» (РегЛек 2020)** 285

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 «БЕАН»: 603003, Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1, корп. 5

Подписано в печать: 11.12.2020

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

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

CONTENTS

Reviews

- Analysis of Promising Approaches to COVID-19 Vaccine Development**
G. G. Onishchenko, T. E. Sizikova, V. N. Lebedev, S. V. Borisevich 216
- Russian and International Regulatory Recommendations for the Development and Marketing Authorisation of COVID-19 Vaccines in the Context of the Pandemic**
A. A. Soldatov, Zh. I. Avdeeva, V. P. Bondarev, V. A. Merkulov, V. D. Mosyagin, V. B. Ivanov,
D. V. Gorenkov, L. M. Khantimirova 228
- General Characteristics of Adjuvants and Their Mechanism of Action (Part 1)**
N. A. Alpatova, Zh. I. Avdeeva, S. L. Lysikova, O. V. Golovinskaya, L. A. Gayderova 245

Original articles

- Development and Validation of a Biolayer Interferometry Method for Determination of Human Anti-PD-1 Monoclonal Antibody Concentration in Cynomolgus Serum**
K. V. Ulyanova, A. A. Kazarov, M. S. Pantyushenko, A. A. Olenov, I. V. Lyagoskin, V. M. Simonov 257
- Study on Hemostimulating Properties of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor**
G. G. Shimina, A. V. Bateneva, S. G. Gamaley, T. I. Esina, T. G. Tereshchenko, E. D. Danilenko 268
- Theoretical and Experimental Substantiation of Alternative Methods for Quality Control of Live Anthrax Vaccine**
I. V. Kasina, S. A. Alekseeva, T. I. Nemirovskaya 277

Chronicle

- Applied Research Conference**
“Current Approaches to Evaluation of Medicinal Products” (RegLek 2020) 285

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 codes are provided in the catalogue “Pressa Rossii”—T57941, in the Rospechat agency’s catalogue “Izdaniya organov NTI”,
and in the catalogue of Ural-Press agency—57941. Print run: 100 copies. Free price

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

Printing office “BEAN”: 1/5 Barricad St., Nizhny Novgorod 603003

Passed for printing: December 11, 2020

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

Анализ перспективных направлений создания вакцин против COVID-19

Г. Г. Онищенко¹, Т. Е. Сизикова², В. Н. Лебедев², С. В. Борисевич^{2,*}

¹ Федеральное 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

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, ул. Октябрьская, д. 11, Сергиев Посад-6, Московская область, 141306, Российская Федерация

На начало ноября 2020 г. в мире зарегистрировано 50 млн случаев COVID-19. Для формирования коллективного иммунитета, который будет препятствовать возникновению повторных вспышек заболевания, этот показатель является явно недостаточным. Карантинные мероприятия способны лишь в какой-то мере ограничить распространение заболевания, поэтому актуальным является вопрос о создании специфических средств профилактики в отношении данной нозологической формы, направленных на искусственное формирование коллективного иммунитета против COVID-19. В основе коллективного иммунитета лежит непрягая защита человеческой популяции в целом при иммунизации определенной его части. Вакцинация является наиболее действенным способом предотвращения развития эпидемической вспышки. Цель работы — анализ перспективных направлений создания вакцин против новой коронавирусной инфекции COVID-19. Представлены результаты обобщения информации о разработке и клинических исследованиях вакцин против COVID-19 в различных странах, проведен анализ достоинств и недостатков различных платформ для создания вакцин (аттенуированные, инактивированные, субъединичные, ДНК- и РНК-вакцины, векторные рекомбинантные вакцины). Представлен возможный дизайн вакцин нового поколения. Сделан вывод о том, что вакцины против COVID-19 могут быть созданы как для иммунизации групп высокого риска, так и для проведения массовой иммунизации. Приоритетное положение при решении второй из указанных задач занимает создание векторных рекомбинантных вакцин на основе аденовируса человека или обезьяны, массовое производство которых уже анонсировано.

Ключевые слова: COVID-19; вирус SARS-CoV-2; аттенуированные вакцины; инактивированные вакцины; субъединичные вакцины; ДНК-вакцины; РНК-вакцины; векторные рекомбинантные вакцины; клинические исследования; коллективный иммунитет

Для цитирования: Онищенко ГГ, Сизикова ТЕ, Лебедев ВН, Борисевич СВ. Анализ перспективных направлений создания вакцин против COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(4):216–227. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-216-227>

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

Analysis of Promising Approaches to COVID-19 Vaccine Development

G. G. Onishchenko¹, T. E. Sizikova², V. N. Lebedev², S. V. Borisevich^{2,*}

¹ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

² 48 Central Scientific Research Institute, 11 Oktyabr'skaya St., Sergiev Posad-6, Moscow Oblast 141306, Russian Federation

The number of confirmed COVID-19 cases worldwide amounted to 50 million at the beginning of November 2020. This is clearly not enough for the formation of herd immunity, which will prevent repeated outbreaks of the disease. Quarantine measures can only curb the spread of the disease to some extent, therefore specific preventive measures are needed to create collective immunity to COVID-19. The underlying principle of collective immunity is indirect protection of the whole of the population by immunising a certain part of it. Vaccination is the most effective approach to prevention of epidemic outbreaks. The aim of the study was to analyse promising approaches to the development of vaccines against novel coronavirus COVID-19 infection. The paper summarises data on development studies and clinical trials of COVID-19 vaccines conducted in different countries. It analyses the pros and cons of different platforms for vaccine development (attenuated vaccines, inactivated vaccines, subunit vaccines, DNA and RNA vaccines, recombinant vector vaccines). The paper presents a potential design of novel vaccines. It was concluded that COVID-19 vaccines might be developed both for immunising high-risk groups and for mass immunisation. An optimal solution for the second task would be to develop human or monkey adenovirus vector-based vaccines whose mass production has already been unveiled.

Key words: COVID-19; SARS-CoV-2 virus; attenuated vaccines; inactivated vaccines; subunit vaccines; DNA vaccines; RNA vaccines; recombinant vector vaccines; clinical trials; herd immunity

For citation: Onishchenko GG, Sizikova TE, Lebedev VN, Borisevich SV. Analysis of promising approaches to COVID-19 vaccine development. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):216–227. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-216-227>

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

Вспышка нового коронавирусного заболевания, впоследствии получившего название COVID-19, начавшаяся в декабре 2019 г. в г. Ухань (КНР)¹ [1], переросшая в объявленную ВОЗ 11 марта 2020 г. пандемию, охватившую свыше 200 стран, по-прежнему продолжает оказывать огромное воздействие на социальную, экономическую, политическую и культурную сферы деятельности человечества.

Быстрому распространению заболевания способствовали следующие факторы:

- человечество столкнулось с новым зооантропонозом; коллективный иммунитет, необходимый для предотвращения распространения заболевания, отсутствует;

- при отсутствии эффективных средств специфической профилактики и лечения заболевания в качестве основного средства борьбы с распространением COVID-19 стали ограничительные меры — изоляция больных, эффективность которой естественным образом является сниженной ввиду характерного для COVID-19 большого числа легких и даже бессимптомных случаев, при которых тем не менее происходит трансмиссия возбудителя, а также общее снижение числа социальных контактов в популяции, для эффективного контроля которого, однако, требуется введение жестких ограничительных мер.

На начало ноября 2020 г. в мире зарегистрировано 50 млн случаев заболевания². Даже с учетом того, что реальное количество больных COVID-19 намного выше, тем не менее оно недостаточно для формирования коллективного иммунитета, который будет препятствовать дальнейшему распространению заболевания.

Очевидно, что карантинные мероприятия способны лишь в какой-то мере ограничить распространение заболевания COVID-19 [2], поэтому актуальным является вопрос о создании специфических средств профилактики в отношении данной нозологической формы, направленных на искусственное формирование популяционного иммунитета против COVID-19. Трансмиссия вируса SARS-CoV-2 может быть блокирована посредством коллективного иммунитета, приобретенного при иммунизации определенной доли популяции, при этом вакцина защищает не только подвергшегося вакцинации, но и косвенно неиммунизированных людей.

Концепция «коллективного иммунитета» опирается на непрямую защиту человеческого коллектива в целом с помощью иммунизации определенной его части [3]. В результате достижения необходимого уровня коллективного иммунитета происходит обрыв цепочек распространения инфекции, что

препятствует расширению масштабов эпидемии. Вакцинация является наиболее действенным способом предотвращения распространения заболевания. Ее проведение может снизить риск заражения вирусом SARS-CoV-2, долю тяжелых случаев и летальных исходов.

Цель работы — анализ перспективных направлений создания вакцин против новой коронавирусной инфекции COVID-19.

При разработке вакцины против COVID-19 актуальной задачей является не только создание препарата, предназначенного в качестве профилактического средства для ограниченных по численности групп риска (медицинские работники, а также лица, непосредственно контактировавшие с больными) [4], но и создание препарата, пригодного для проведения массовой иммунизации.

Интенсивная разработка вакцин против COVID-19 проводится в ряде стран. Согласно прогнозу ВОЗ (февраль 2020 г.), вакцина против COVID-19 может быть доступна не ранее чем через 18 месяцев (то есть в августе 2021 г.)³. Необходимо отметить, что на создание вакцины против инфекционных заболеваний обычно уходит несколько лет. Например, в области создания средств специфической профилактики коронавирусных инфекций проводились исследования по разработке вакцин против MERS и SARS. Так, для вакцины против MERS (Оксфордский университет, Великобритания) в клинических исследованиях II фазы была показана высокая иммуногенность⁴. Однако до августа 2020 г. не было ни одной зарегистрированной вакцины от коронавирусных инфекций⁵.

Быстрое распространение заболевания послужило стимулом для национальных правительств и международных альянсов, финансирующих процесс создания вакцин. Объединением по инновационным технологиям в области противозидемических препаратов (The Coalition for Epidemic Preparedness Innovations, CEPI) совместно с Глобальным альянсом по вакцинам и иммунизации (Global Alliance for Vaccines and Immunisation, GAVI) был создан фонд, предназначенный для проведения исследований кандидатных вакцин [5].

4 мая 2020 г. ВОЗ анонсировала развертывание международной программы Solidarity Trial⁶ для проведения одновременной оценки вакцин, находящихся на этапе клинических исследований II–III фазы. Предпринятые усилия привели к определенным результатам. В марте 2020 г. были разработаны кандидатные вакцины, с четырьмя из которых были начаты клинические исследования [5].

В апреле 2020 г. поступила информация о разработке 115 вакцин против COVID-19, по меньшей мере 6 из которых,

¹ В Китае обнаружен новый вид коронавируса. 10.01.2020. ВОЗ. <https://www.euro.who.int/ru/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/news/news/2020/01/novel-coronavirus-emerges-in-china>

² WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int>

³ Grenfell R, Drew T. Here's why it's taking so long to develop a vaccine for the new coronavirus. 17.02.2020. ScienceAlert. <https://www.sciencealert.com/who-says-a-coronavirus-vaccine-is-18-months-away>

⁴ MERS vaccine shows promise in clinical trial, say researchers. 27.04.2020. EPR. <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/117962/mers-vaccine-shows-promise-in-clinical-trial-say-researchers>

⁵ Минздрав России зарегистрировал первую в мире вакцину от COVID-19. 11.08.2020. Минздрав России. <https://minzdrav.gov.ru/news/2020/08/11/14657-minzdrav-rossii-zaregistroval-pervuyu-v-mire-vaktsinu-ot-covid-19>

⁶ Вступительное слово «Объединение усилий для ускорения разработки, производства и справедливого распределения вакцин, средств диагностики и лечения COVID-19». Онлайн-мероприятие Европейской комиссии по объявлению взносов. 04.05.2020. ВОЗ. <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-on-line-pledging-event-hosted-by-the-european-commission>

<https://www.who.int/ru/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/global-research-on-novel-coronavirus-2019-ncov/solidarity-clinical-trial-for-covid-19-treatments>

согласно оценке SEPI, могут быть одобрены для проведения клинических исследований. Согласно другим данным, для проведения одновременных исследований могут быть отобраны 10 вакцин, из которых в дальнейшем следует выбрать наиболее перспективные для заключительного лицензирования их производства [5].

В мае 2020 г. ВОЗ сообщила о находящихся в стадии разработки 159 кандидатных вакцинах против COVID-19, 5 из которых проходили фазу I–II и еще 7 — фазу I клинических исследований. По данным ВОЗ, на начало июля 2020 г. на стадии клинических исследований находились 17 различных видов вакцин против COVID-19⁷.

На начало ноября 2020 г. клинические исследования I–III фазы проходят 7 различных видов вакцин против COVID-19.

В частности:

- биофармацевтическая компания Altimune (США) разработала интраназальную вакцину против COVID-19 на основе технологической платформы, аналогичной противогриппозной вакцине NasoVAX™, разработанной данной компанией⁸;

- компания Medicago (Канада) разрабатывает вакцину против COVID-19 на основе вирусоподобных частиц вируса SARS-CoV-2⁹;

- компании Inovio Pharmaceuticals (США) и Институт здравоохранения Кореи (Южная Корея) разрабатывают новую коронавирусную вакцину INO-4800. Уже к 3 марта 2020 г. было подготовлено 3000 доз препарата для проведения клинических исследований в США, КНР и Южной Корее. Для проведения фазы III клинических исследований (или использования в экстренных случаях) Inovio Pharmaceuticals изготовила 1 млн доз вакцины¹⁰;

- компания Entos Pharmaceuticals (США) разрабатывает ДНК-вакцину Fusogenix на основе платформы доставки лекарств Fusogenix для предотвращения COVID-19, представляющей собой протеолипидный носитель, предназначенный для доставки нескольких эпитопов структурных белков вируса SARS-CoV-2, которые будут стимулировать иммунный ответ в организме¹¹;

- Институт в Сिएтле Vaccine Research Center и компания Moderna, Inc. (США) разработали вакцину мРНК-1273, которая представляет собой РНК, кодирующую S белок вируса SARS-CoV-2. Клинические исследования начались в марте 2020 г. в трех центрах на территории США. В исследованиях фазы I участвовали 45 мужчин и женщин в возрасте от 18 до 45 лет. При проведении исследований изучено влияние величины иммунизирующей дозы (25, 100 или 250 мкг с интервалом 28 сут)¹². Moderna, Inc. завершила набор 30000 участников для исследования фазы III кандидатной вакцины мРНК-1273 против COVID-19, которое проводится в сотрудничестве с Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний. На 22.10.2020 более 25650 участников получили вторую вакцинацию¹³;

- Научно-исследовательский институт MIGAL (Израиль) модифицировал для профилактики COVID-19 вакцину против

вируса инфекционного бронхита (IBV), разработанную для профилактики заболевания, этиологическим агентом которого является коронавирус птиц. Фрагмент НК, включенный в вакцину, имеет высокое генетическое сходство с коронавирусом человека. При проведении доклинических исследований была показана активность данной вакцины¹⁴;

- компания Tonix Pharmaceuticals (США) создала вакцину TNX-1800, которая представляет собой модифицированный вирус оспы лошадей, экспрессирующий S белок SARS-CoV-2¹⁵;

- компания Clover Biopharmaceuticals (США) разработала рекомбинантную субъединичную вакцину, при этом трансляция вирусспецифического белка проводится при использовании культур клеток млекопитающих. Данная вакцина проходит I фазу клинических исследований¹⁶;

- ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России разработало вакцину Гам-КОВИД-Вак Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, и Гам-КОВИД-Вак-Лио Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2 («Спутник V»), которая стала первой в мире зарегистрированной вакциной против COVID-19¹⁷.

Необходимо отметить, что основные элементы стратегии получения защитных препаратов против COVID-19 были уже разработаны ранее применительно к другим эмерджентным инфекционным заболеваниям, в отношении которых отсутствовали эффективные медицинские средства защиты, например лихорадки Эбола [6].

Потенциальные вакцины могут быть разделены на следующие типы: аттенуированные, инактивированные, ДНК- и РНК-вакцины, субъединичные (пептидные) на основе наночастиц и векторные рекомбинантные вакцины. В последних в качестве вектора используют какой-либо апатогенный либо слабопатогенный для человека вирус (вирус везикулярного стоматита, аденовирусы, вирус вакцины, лентивирусы). Сведения о технологических платформах для создания вакцин против COVID-19 представлены в таблице 1.

Прежде чем рассматривать достоинства и недостатки приведенных в таблице 1 технологических платформ, рассмотрим общие требования, предъявляемые к препаратам данного класса.

В идеале вакцина должна:

- вызывать долговременный иммунитет при однократном введении;

- обладать перекрестной реактивностью по отношению к различным генетическим линиям возбудителя;

- иметь незначительный риск возникновения поствакцинальных осложнений.

При всем этом стоимость вакцины не должна быть ограничительным фактором для ее массового применения.

⁷ COVID-19 Virtual Press conference. 2 July 2020. WHO.

⁸ Single dose intranasal COVID-19 vaccine. Altimune; 2020. <https://altimmune.com/adcovid/>

⁹ Medicago announces positive results in animal trials for its vaccine candidate against COVID-19. 14.05.2020. Press release. Medicago; 2020.

¹⁰ Safety, tolerability and immunogenicity of INO-4800 for COVID-19 in healthy volunteers (NCT04336410). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04336410>

¹¹ Лечение коронавируса 2020: вакцины и лекарственные препараты для борьбы с COVID-19. <https://b-mag.ru/lechenie-koronavirusa-2020-vakciny-i-lekarstvennyye-preparaty-dlja-borby-s-covid-19/>

¹² mRNA-1273 Clinical Development Program. <https://www.cdc.gov/vaccines/acip/meetings/downloads/slides-2020-08/COVID-02-Miller-508.pdf>

¹³ mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. <https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/mrna-1273-sars-cov-2-vaccine>

¹⁴ Safety, tolerability and immunogenicity of INO-4800 for COVID-19 in healthy volunteers (NCT04336410). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04336410>

¹⁵ TNX-1800 (Coronavirus Vaccine). Scientific rationale for TNX-1800 as a vaccine for coronavirus. <https://www.tonixpharma.com/pipeline/tnx-1800-coronavirus-vaccine>

¹⁶ Clover biopharmaceuticals starts phase I COVID-19 vaccine trial. <https://www.clinicaltrialsarena.com/news/clover-vaccine-covid-19-trial>

¹⁷ <http://grls.rosminzdrav.ru>

Таблица 1. Перечень технологических платформ для создания вакцин против COVID-19
 Table 1. List of technological platforms for COVID-19 vaccine development

Технологическая платформа Technological platform	Общее количество кандидатов Total number of candidates	Количество вакцин, проходящих клинические исследования Number of vaccines in clinical trials
Нереплицирующийся вирусный вектор Non-replicating viral vector	15	8
РНК-вакцины RNA vaccines	19	5
ДНК-вакцины DNA vaccines	11	4
Инактивированные вакцины Inactivated vaccines	7	7
Субъединичные вакцины Subunit vaccines	47	13
Реплицирующийся вирусный вектор Replicating viral vector	13	3
Вирусоподобные частицы Virus-like particles	7	2
Живая аттенуированная вакцина Live attenuated vaccine	3	0
Реплицирующийся бактериальный вектор Replicating bacterial vector	1	0
Платформа не идентифицирована Platform not identified	36	0
Общее количество Total number	159	42

Следовательно, приоритетами при создании вакцин являются их безопасность и эффективность, а также возможность производства большого количества, измеряемого в миллиардах доз, для проведения глобальной вакцинации¹⁸.

В качестве основных методических проблем при создании вакцины против COVID-19 следует отметить следующие:

- отсутствие лабораторных животных, которые при экспериментальной инфекции адекватно воспроизводят признаки заболевания человека. В частности, при проведении доклинических исследований вакцин против COVID-19 на низших приматах возможно проведение оценки безопасности и иммуногенности, но не защитной эффективности вакцины. Возможным (но не исчерпывающим) решением данной проблемы может быть использование при проведении доклинических исследований вакцин против COVID-19 иммунодефицитных белых мышей, инфицирование которых вирусом SARS-CoV-2 заканчивается гибелью животных, либо оценка эффективности по достоверному снижению уровня накопления вируса в органах-мишенях животных [7];
- при проведении клинических исследований при оценке возможных последствий вакцинации против COVID-19 необходимо определить риски возникновения феномена ADE (антителозависимого усиления инфекции, развивающегося в ответ на белок S коронавируса), заключающегося в усилении инфекционного процесса вследствие образования инфекционных комплексов вирус-антитело, которые потенциально могут привести к изменению тропности возбудителя, то есть связывание вирионов становится возможным не только ACE2 альвеолярными пневмоцитами типа 2, но и (через FcγRIIA-рецептор) с моноцитами и макрофагами [8, 9].

Феномен ADE может проявляться при снижении концентрации вирусспецифических антител до уровня субнейтрали-

зующего спустя определенное время после проведенной иммунизации.

Преобладающая часть разрабатываемых в настоящее время вакцин (табл. 1) относится к так называемым вакцинам нового поколения. Основой для их разработки послужила опубликованная 11 января 2020 г. нуклеотидная последовательность геномной РНК вируса SARS-CoV-2¹⁹.

В таблице 2 представлены достоинства и недостатки каждого конкретного вида препаратов в плане возможности использования в качестве вакцины против COVID-19. При этом необходимо иметь в виду, что данные вакцины могут быть предназначены как для иммунизации групп высокого риска, так и для проведения массовой иммунизации.

В первую очередь вакцинации подлежат представители группы риска (медицинские работники, а также люди, непосредственно контактировавшие с лицами с подтвержденным диагнозом COVID-19) [4].

В этой связи необходимо отметить, что из всех перечисленных в таблице 1 платформ векторные рекомбинантные вакцины на основе реплицирующегося вирусного вектора обладают преимуществом в плане возможности их получения в промышленных масштабах, что обеспечит возможность проведения массовой иммунизации. Важность решения задачи вакцинации групп высокого риска обуславливает необходимость мониторинга всех (независимо от используемой платформы) разработок по созданию вакцины против COVID-19.

Молекулярно-биологические характеристики коронавируса, в частности роль белка S в механизме адсорбции вирусов на клетки (на поверхности вириона SARS-CoV-2 находятся до 40 подвижных «шипов», образуемых данным белком [10]), определяют дизайн вакцин нового поколения.

¹⁸ R&D Blueprint and COVID-19. WHO. <https://www.who.int/teams/blueprint/covid-19>

¹⁹ Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1, complete genome. NCBI Reference Sequence: NC_045512.2. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_045512.1

Кандидатные вакцины против COVID-19 должны быть основаны на использовании в качестве антигенов отдельных субъединиц структурных белков S (обязательный компонент) и N (возможный дополнительный компонент) вируса SARS-CoV-2 (взятых отдельно или в комбинации), которые при введении обуславливают выраженный иммунный ответ (гуморальный и Т-клеточный). При этом желательно, чтобы вставка гена структурного белка S кодировала аминокислотную последовательность аргинин–аргинин–аланин–серин–валин–аланин–серин, которая является идентичной соответствующему участку белка человека ENaC-α [11].

Однако количество возможных путей создания вакцин нового поколения, включающих выбор платформы, выбор дизайна вакцины и способа ее получения, а также оценки предполагаемой эффективности вакцины при проведении до-

клинических исследований настолько велико, что каждую отдельную методику получения вакцины можно рассматривать в качестве самостоятельной научной разработки.

Вакцина становится доступной для использования только после завершения всего цикла клинических исследований. Основной составляющей предрегистрационных клинических исследований является мониторинг нежелательных реакций на вакцину. В клинических исследованиях фазы I проводят определение в первую очередь безопасности, а также иммуногенности кандидатной вакцины на ограниченной по численности (10–100) группе добровольцев (обычно здоровые взрослые). При проведении клинических исследований фазы II проводят оценку опасности потенциального побочного действия, иммунных реакций, а также определение оптимальной схемы иммунизации. Объем выборки при

Таблица 2. Достоинства и недостатки технологических платформ для создания вакцин против COVID-19
Table 2. Benefits and drawbacks of the technological platforms for COVID-19 vaccine development

Технологическая платформа Technological platform	Достоинства Benefits	Недостатки Drawbacks
Живая аттенуированная вакцина Live attenuated vaccine	Потенциально самый эффективный вид вакцины для проведения иммунизации. Простота получения. Возможность получения в промышленных масштабах Potentially the most effective type of vaccine for immunisation. Easy to produce. Possibilities for industrial-scale production	Применительно к вакцинам против COVID-19 использование данной платформы маловероятно ввиду наличия большой доли бессимптомных форм протекания заболевания и связанной с этим неопределенностью данных, которые могли бы быть получены при проведении клинических исследований. Возможность реверсии аттенуированного штамма к дикому типу ввиду генетической пластичности коронавирусов The platform is unlikely to be used for COVID-19 vaccines due to the high proportion of asymptomatic cases and the associated uncertainty of data that could be obtained from clinical trials. Possibility of the attenuated strain reversion to the wild type due to genetic flexibility of coronaviruses
Инактивированные вакцины Inactivated vaccines	Простота получения. Реципрокность эпитопов инактивированного и нативного возбудителя Easy to produce. Reciprocity of epitopes of the inactivated and native pathogens	Относительно низкий уровень накопления вируса <i>in vitro</i> . Необходимость использования культуры клеток, лицензированной для получения вакцин. Относительно слабая иммуногенность и связанная с ней необходимость проведения повторной иммунизации Relatively low level of virus accumulation <i>in vitro</i> . The need to use a cell culture licensed for vaccine production. Relatively low immunogenicity and the associated need for re-immunisation
РНК-вакцины RNA vaccines	Наиболее простая конструкция, необходимая для производства специфического антигена в макроорганизме. Отсутствие возможности интеграции в геном человека The simplest construct that can produce specific antigen in a macroorganism. It is not capable of integrating into the human genome	Необходимость использования специальной аппаратуры для вакцинации. Относительно слабая иммуногенность и связанная с ней необходимость проведения повторной иммунизации. Сложность получения в промышленных масштабах The need to use special equipment for vaccination. Relatively low immunogenicity and the associated need for re-immunisation. Difficulties associated with industrial-scale production
ДНК-вакцины DNA vaccines	Оценены для целого ряда заболеваний, безопасны, слабореактогенны These vaccines have already been evaluated for a variety of diseases, they are safe and have low reactogenicity	Необходимость использования специальной аппаратуры для вакцинации (gene gun — генная пушка), относительно слабая иммуногенность и связанная с ней необходимость высоких иммунизирующих доз и проведения повторной иммунизации для достижения требуемого иммунного ответа The need to use special equipment for vaccination (gene gun), relatively low immunogenicity and the associated need for high immunisation doses and repeat immunisation in order to achieve the desired immune response
Субъединичные вакцины Subunit vaccines	Безопасны, слабореактогенны Safety, low reactogenicity	Относительно слабая иммуногенность и связанная с ней необходимость проведения повторной иммунизации Relatively low immunogenicity and the associated need for re-immunisation
Вирусоподобные частицы Virus-like particles	Безопасны Safety	Необходимость многократной иммунизации. Высокая стоимость вакцины. Сложный процесс получения, препятствующий ее серийному производству The need for multiple immunisations. A high cost of the vaccine. A complicated production process that hinders mass production

Технологическая платформа Technological platform		Достоинства Benefits	Недостатки Drawbacks
Векторные рекомбинантные вакцины Recombinant vector vaccines	на основе аденовируса adenovirus-based	Наличие апробированных технологических платформ. Установленная эффективность вакцин на данной платформе. Возможность получения в промышленных масштабах Availability of time-tested technological platforms. Proven effectiveness of vaccines created using this platform. Possibilities for industrial-scale production	Неопределенность иммунного статуса макроорганизма (ранее перенесенное заболевание, вызванное аденовирусом, может негативно влиять на эффективность вакцины). Эффективный иммунный ответ при однократной иммунизации развивается при использовании высоких иммунизирующих доз, для повышения эффективности иммунизации необходимо проведение бустирования Lack of information about the macroorganism's immune status (a previous adenovirus infection may affect the vaccine's effectiveness). High immunisation doses are needed to elicit an effective immune response from single immunisation. Booster doses are required in order to increase immunisation effectiveness
	на основе вируса везикулярного стоматита vesicular stomatitis virus-based	Наличие апробированных технологических платформ. Для получения иммунного ответа достаточно проведения однократной иммунизации. Возможность получения в промышленных масштабах Availability of time-tested technological platforms. A single immunisation is sufficient for eliciting immune response. Possibilities for industrial-scale production	Возможны побочные действия: лейкопения, лимфопения и нейтропения в течение первых трех дней после вакцинации, артралгия, артриты примерно у 20% иммунизированных Potential side effects: leukopenia, lymphopenia and neutropenia during the first three days after vaccination, arthralgia, arthritis in about 20% of the vaccinated individuals
	на основе ортопоксвирусов orthopoxvirus-based	Информационная емкость генома вектора, позволяющая проводить вставку нескольких гетерологических последовательностей The information capacity of the vector genome allows for insertion of several heterologous sequences	Неопределенность иммунного статуса макроорганизма. Возможное отсутствие эффекта при иммунизации наиболее уязвимой возрастной группы (люди пожилого возраста) ввиду того, что они прошли вакцинацию против оспы Lack of information about the macroorganism's immune status. Potential lack of effect when immunising the most vulnerable age group (elderly people) due to previous vaccination against smallpox
	на основе лентивирусов lentivirus-based	Способность лентивирусов к репликации в неделящихся клетках Lentiviruses are capable of replicating in non-proliferating cells	Отсутствие апробированных технологических платформ для создания на основе лентивирусов вакцин против вирусных инфекционных заболеваний Lack of time-tested technological platforms for production of lentivirus-based vaccines against viral infections

этом составляет 100–1000 человек. Фаза III клинических исследований включает оценку эффективности кандидатной вакцины при профилактике заболеваний, сбор информации о разнородной иммунизированной популяции в течение продолжительного времени (обычно не менее 1 года). Объем выборки на этой стадии клинических исследований составляет 1000–10000 человек. Лишь после получения положительных данных фазы III осуществляется подача заявки на лицензирование в контролирующий орган о применении вакцины и решении ее использования.

Следует отметить, что в условиях чрезвычайной ситуации возможна регистрация вакцины по ускоренной схеме²⁰. Так, вакцина Гам-КОВИД-Вак и Гам-КОВИД-Вак-Лио (коммерческое название «Спутник V») зарегистрирована после проведения фазы I/II клинических исследований²¹, завершенных 1 августа

2020 г. [12]. Вакцина получила свидетельство о регистрации от Минздрава России 11 августа 2020 г. и в соответствии с правилами, принятыми во время пандемии, может использоваться для вакцинации населения в России.

Данная вакцина, созданная на основе рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 типа, в ходе нерандомизированных клинических исследований фазы I/II на 76 добровольцах в возрасте от 18 до 60 лет показала выработку как гуморального, так и Т-клеточного иммунного ответа у 100% иммунизированных [13]. Выработка гуморального иммунного ответа была подтверждена выявлением вирусспецифических антител, в том числе и вируснейтрализующих антител в сыворотке крови вакцинированных. Наличие клеточного иммунного ответа в результате вакцинации подтверждено активацией иммунных клеток добровольцев при взаимодействии с S белком вируса SARS-CoV-2.

²⁰ Постановление Правительства Российской Федерации от 03.04.2020 № 441 (ред. от 01.09.2020) «Об особенностях обращения лекарственных препаратов для медицинского применения, которые предназначены для применения в условиях угрозы возникновения, возникновения и ликвидации чрезвычайной ситуации и для организации оказания медицинской помощи лицам, пострадавшим в результате чрезвычайных ситуаций, предупреждения чрезвычайных ситуаций, профилактики и лечения заболеваний, представляющих опасность для окружающих, заболеваний и поражений, полученных в результате воздействия неблагоприятных химических, биологических, радиационных факторов».

²¹ О вакцине для профилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19 «Гам-КОВИД-Вак», разработанной ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России. <https://roszdravnadzor.gov.ru/news/22768>

Таблица 3. Сведения по кандидатным вакцинам против COVID-19, проходящим фазы I–III клинических исследований (по состоянию на ноябрь 2020 г.)
Table 3. Information on COVID-19 candidate vaccines in Phase I–III clinical trials (as of November 2020)

Страна Country	Производитель/ спонсор Manufacturer/sponsor	Название вакцины Vaccine	Платформа Platform	Фаза исследова- ний (количество участников) Phase (number of subjects)	Время проведения Time of the trial	Источник литературы Literature source	Примечание Comments
KНР PRC	CanSino Biologics, Пекинский институт био- технологий и Академия военно-медицинских наук CanSino Biologics, Beijing Institute of Biotech- nology and Academy of Military Medical Sciences	Ad5-nCoV	Рекомбинантный аденовирус человека 5 типа в качестве вектора Recombinant adenovirus type 5 vector	I (100)	Март–декабрь 2020 March–December 2020	Ссылка [5] сноска 22 Reference [5] Footnote ²²	Рандомизированные плацебо-контро- лируемые исследования Randomised, placebo-controlled trials
				II (508)	Сентябрь 2020– декабрь 2021 September 2020– December 2021	Ссылка [13] Reference [13]	
				III (40000)	Ссылка [23] Footnote ²³		
KНР PRC	Sinovac Biotech Ltd.	Coro- naVac	Инактивированный вирус SARS-CoV-2 Inactivated SARS-CoV-2 virus	I–II (744) I–II (422)	Апрель–декабрь, май–июнь 2020 April–December, May–June 2020	Ссылка [14] сноска 24 Reference [14] Footnote ²⁴	
				III (25540)	Июль 2020– октябрь 2021 July 2020–October 2021	Сноска [25] Footnote ²⁵	
KНР PRC	Sinopharm Group Co., Ltd, Институт биологических продуктов, г. Пекин, Институт вирусологии, г. Ухань Sinopharm Group Co., Ltd, Beijing Institute of Biological Products, Wuhan Institute of Virology	б/н No name	Инактивированный вирус SARS-CoV-2 Inactivated SARS-CoV-2 virus	I–II (320)	Апрель 2020– июль 2021 April 2020–July 2021	Ссылка [15] сноска 26 Reference [15] Footnote ²⁶	
				III (48000)	Сноска [27] Footnote ²⁷		

²² Phase I clinical trial of a COVID-19 vaccine in 18–60 healthy adults (CTCOVID-19) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04313127). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04313127>.

²³ Phase III trial of a COVID-19 vaccine of adenovirus vector in adults 18 years old and above (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04526990). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04526990>

²⁴ Safety and immunogenicity study of inactivated vaccine for prophylaxis of SARS-CoV-2 infection (COVID-19) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04352608). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04352608>

²⁵ Clinical trial for SARS-CoV-2 vaccine (COVID-19) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04582344). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04582344>

<https://www.scmp.com/news/world/americas/article/3106177/tests-show-coronavirus-vaccine-chinas-sinovac-safe-says-brazil>

<https://www.cnnindonesia.com/teknologi/20200805023946-199-532230/fakta-terbaru-uji-klinis-vaksin-covid-19-di-bandung>

²⁶ A randomised, double blind, placebo parallel-controlled phase III clinical trial for inactivated novel coronavirus pneumonia vaccine (Vero cells). <http://www.chictr.org.cn/showprojen.aspx?proj=52227>

²⁷ Maxwell C. Coronavirus: UAE authorises emergency use of vaccine for frontline workers. <https://www.thenationalnews.com/uae/health/coronavirus-uae-authorises-emergency-use-of-vaccine-for-frontline-workers-1.1077680>

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

Страна Country	Производитель/ спонсор Manufacturer/sponsor	Название вакцины Vaccine	Платформа Platform	Фаза исследования/ участников) Phase (number of subjects)	Время проведения Time of the trial	Источник литературы Literature source	Примечание Comments
КНР PRC	Генно-иммунный медицинский институт, г. Шэньчжэнь Shenzhen Geno-Immune Medical Institute	COVID-19/ aAPC	Вектор на основе лентивируса, вирусспецифичный рекомби- нантный антиген, продуцируе- мый дендритными клетками Lentivirus-based vector, virus- specific recombinant antigen produced by dendritic cells	I (100)	Март 2020–2023 March 2020–2023	Ссылка [5] сноска ²⁸ Reference [5] Footnote ²⁸	Рандомизированные плацебо-контро- лируемые исследования Randomised, placebo-controlled trials
		LV- SMENP- DC	Минигеномная вакцина на ос- нове лентивируса, дендритные клетки, трансфицированные лентивирусным вектором The minigene vaccine, based on lentivirus, dendritic cells transfect- ed by lentiviral vector			Ссылка [5] сноска ²⁹ Reference [5] Footnote ²⁹	
Велико- британия UK	Оксфордский университет, AstraZeneca Oxford University, AstraZeneca	ChAdOx1 nCoV-19	Аденовирусный вектор Adenovirus vector	I–II (543)	Апрель–август 2020 April–August 2020	Ссылка [16] Reference [16]	
				III (30000)	Май 2020–август 2021 May 2020–August 2021	Сноска ³⁰ Footnote ³⁰	
США USA	Moderna, Национальный институт аллергологии и инфекционных заболеваний Moderna, National Institute of Allergy and Infectious Diseases	мРНК- 1273 mRNA- 1273	Липидные наночастицы содержащие фрагмент мРНК вируса SARS-CoV-2 Lipid nanoparticles containing an mRNA fragment of SARS-CoV-2	I (45)	Март–май 2020 March–May 2020	Ссылки [5, 17] сноска ³¹ References [5, 17] Footnote ³¹	Внутримышечное введение липидных наночастиц препарата Intramuscular injection of lipid nanopar- ticles
				II (600)	Май–июль 2020 May–July 2020		Возраст половины испытуемых более 60 лет Half of the subjects were over 60 years old
				III (30000)	Июль 2020– октябрь 2022 July 2020– October 2022	Сноска ³² Footnote ³²	Наблюдение за вакцинированными в течение 2 лет Post-vaccination observation for 2 years

²⁸ Safety and immunity of Covid-19 aAPC vaccine (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04299724). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04299724>

²⁹ Immunity and safety of Covid-19 synthetic minigene vaccine (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04276896). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04276896>

³⁰ Phase III double-blind, placebo-controlled study of AZD1222 for the prevention of COVID-19 in adults (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04516746). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04516746>

³¹ Safety and immunogenicity study of 2019-nCoV vaccine (mRNA-1273) for Prophylaxis of SARS-CoV-2 infection (COVID-19) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04283461). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04283461>

³² A study to evaluate efficacy, safety, and immunogenicity of mRNA-1273 vaccine in adults aged 18 years and older to prevent COVID-19 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04470427). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04470427>

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

Страна Country	Производитель/ спонсор Manufacturer/sponsor	Название вакцины Vaccine	Платформа Platform	Фаза исследования (количество участников) Phase (number of subjects)	Время проведения Time of the trial	Источник литературы Literature source	Примечание Comments
США, Южная Корея USA, South Korea	Inovio Pharmaceuticals, CEPI, Институт здравоохранения Кореи Inovio Pharmaceutical, CEPI, Korea National Institute of Health	INO-4800	ДНК-плаزمид DNA plasmid	I-II (40)	Апрель–ноябрь 2020 April–November 2020	Сноски ³³ Footnotes ³³	Фаза I–II в Южной Корее одновременно с фазой I в США Phases I–II in South Korea parallel to Phase I in the USA
Германия, США Germany, USA	BioNTech, Fosun Pharma, Pfizer	BNT162	mРНК mRNA	I–II (60) III (30000)	Апрель 2020– май 2021 April 2020–May 2021	Ссылка [18] Reference [18] Сноска ³⁴ Footnote ³⁴	Рандомизированные плацебо-контро- лируемые исследования Randomised, placebo-controlled trials
Австралия Australia	Novavax	NVX- CoV2373	Рекомбинантный белок S виру- са SARS-CoV-2 Recombinant S protein of SARS- CoV-2	I–II (131)	Май 2020– июль 2021 May 2020–July 2021	Сноска ³⁵ Footnote ³⁵	Введение наночастиц препарата с адьювантом Administration of nanoparticles with an adjuvant
Россия Russia	«НЦЭМ им. Н.Ф. Гам- лея» Минздрава России Gamaleya National Centre of Epidemiology and Microbiology	Гам- КОВИД- Вак и Гам- КОВИД- Вак-ЛИО Gam-CO- VID-Vac and Gam- COVID- Vac-LYO	Рекомбинантные аденовирусы человека 5 и 26 типов в каче- стве вектора Recombinant human adenovi- ruses types 5 and 26 used as vectors	I–II (76)	Июнь–август 2020 June–August 2020	Ссылка [12] Reference [12]	В полной дозе вакцину получили 20 человек (для каждой лекарствен- ной формы) Full vaccine doses were administered to 20 subjects (for each dosage form)
		ЭпиВак Корона EpiVac Corona	Рекомбинантный белок S вируса SARS-CoV Recombinant S protein of SARS- CoV-2	III (40000)	Сентябрь 2020– май 2021 September 2020– May 2021	Сноска ³⁶ Footnote ³⁶	Рандомизированные плацебо-контро- лируемые исследования Randomised, placebo-controlled trials
	ГНЦ ВБ «Вектор» Роспо- требнадзора State Research Centre of Virology and Biotechnol- ogy "Vector"	ЭпиВак Корона EpiVac Corona	Рекомбинантный белок S вируса SARS-CoV Recombinant S protein of SARS- CoV-2	I–II (100)	Июль– сентябрь 2020 July–Septem- ber 2020	Сноска ³⁷ Footnote ³⁷	Фаза I: 14 волонтеров в возрасте от 18 до 30 лет, фаза II: 86 волонтеров в возрасте от 18 до 60 лет Phase I: 14 volunteers aged 18 to 30, Phase II: 86 volunteers aged 18 to 60

³³ Ivi, INOVIO, and KNH to partner with CEPI in a phase I/II clinical trial of INOVIO's COVID-19 DNA vaccine in South Korea. <https://www.ivi.int/ivi-inovio-and-knh-to-partner-with-cepi-in-a-phase-i-ii-clinical-trial-of-inovios-covid-19-dna-vaccine-in-south-korea/>

³⁴ Lovelace B. Jr. Pfizer and BioNTech began late-stage human trial for coronavirus vaccine Monday. CNBC. <https://www.cnbc.com/2020/07/27/pfizer-and-biontech-began-late-stage-human-trial-for-coronavirus-vaccine-monday.html>

³⁵ NVX-CoV2373 COVID-19 vaccine candidate phase 1/2, part 1, Clinical Trial Results. <https://www.targetsafty.info/alert/reference/77607>

³⁶ Clinical trial of efficacy, safety, and immunogenicity of Gam-COVID-Vac vaccine against COVID-19 (RESIST) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04530396). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04530396?term=vaccine&cond=covid-19&draw=3>

³⁷ Study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of "EpiVacCorona" vaccine for the prevention of COVID-19 (EpiVacCorona). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04527575>

Все добровольцы хорошо перенесли исследования, не было зарегистрировано серьезных нежелательных реакций.

В таблице 3 представлен перечень кандидатов в вакцины против COVID-19, находящихся на стадии клинических исследований. Испытуемые вакцины сгруппированы по странам-производителям.

На возможность проведения массовой вакцинации против COVID-19 в будущем могут влиять несколько факторов, из которых главным является материальное обеспечение. Необходимо отметить, что используемая технологическая платформа для создания вакцины не оказывает существенного влияния на затраты.

В настоящее время уже анонсированы исследования, результаты которых в дальнейшем могут быть использованы при создании вакцины против COVID-19, пригодной для проведения массовой иммунизации³⁸.

Наиболее значимыми исследованиями при разработке вакцины против COVID-19 (потенциально пригодной для массового применения) являются следующие. В КНР в мае 2020 г. на 2575 добровольцах было проведено исследование 5 различных вакцин. Следует отметить проведенную Академией военно-медицинских наук КНР разработку генно-инженерной вакцины против COVID-19 на основе человеческого рекомбинантного аденовируса типа 5. Вакцина признана безопасной, при выраженной иммуногенности нежелательные реакции при иммунизации отсутствовали³⁹.

Вакцина против COVID-19, разработанная Институтом биологических продуктов (г. Ухань), в ходе клинических плацебо-контролируемых исследований фазы I/II на 1120 добровольцах показала выраженную иммуногенность. В экспериментах были использованы 3 иммунизирующие дозы (низкая, средняя и высокая) при двукратном введении с интервалом 14, 21 и 28 сут. Установлено, что частота сероконверсии на 28-е сут после заключительной иммунизации при любой из изученных схем составила 100%. При проведении клинических исследований фазы III предполагается кооперация с другими странами. Компания Sinopharm Group Co., Ltd (КНР) планирует производить 200 млн доз вакцины в год⁴⁰.

В мае 2020 г. после получения результатов I фазы клинических исследований вакцины мРНК-1273 компания Moderna приступила к проведению II фазы, в которой приняли участие 600 добровольцев, из которых половина имеет возраст старше 60 лет. 27 июля 2020 г. компания начала проведение III фазы клинических исследований. В рамках III фазы до конца октября предполагается привить 30000 добровольцев из США, среди которых также будут пожилые люди. Вакцинацию 100 мкг

мРНК-1273 или плацебо проведут дважды с промежутком в 28 сут, а затем исследователи (6 раз в течение двух лет) проведут определение уровня антител и будут наблюдать заболевание и отслеживать интенсивность проявления заболевания⁴¹.

Оксфордский университет объявил о разработке вакцины ChAdOx1 nCoV-19 на основе аденовирусного вектора⁴². С 27 марта 2020 г. начаты клинические исследования фазы I с участием 510 добровольцев в возрасте от 18 до 55 лет⁴³. Результатом проведенных исследований явилось создание вакцины, получившей коммерческое название AZD1222, — векторной рекомбинантной вакцины на основе аденовируса шимпанзе, содержащей вставку гена белка S вируса SARS-CoV-2. Предполагается, что эта вакцина будет использоваться при двукратном введении: праймирование в дозе $5,0 \times 10^{10}$, бустирование — $2,5 \times 10^{10}$ вирусных частиц (в пересчете на рекомбинантный вирус)⁴⁴. В настоящее время проводятся клинические исследования III фазы вакцины AZD1222 на 30000 взрослых добровольцах.

В настоящее время создаются производственные мощности для наработки необходимых объемов вакцин против COVID-19. Британско-шведская компания AstraZeneca создала производственные линии для выпуска вакцин в США, Европе, Индии, планируется создание такой линии и в КНР⁴⁵.

В конце августа в США начата III фаза клинических исследований вакцины ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222), однако испытания были приостановлены после того, как в ходе испытаний в Британии у одного из волонтеров был диагностирован поперечный миелит, воспаление спинного мозга, обычно вызываемое инфекциями. Несмотря на то что не установлена связь между получением экспериментальной вакцины и заболеванием миелитом, данное обстоятельство может задержать сроки поступления вакцины на рынок⁴⁶.

Проблемы, возникшие при исследованиях вакцины ChAdOx1 nCoV-19, к сожалению, не являются уникальным явлением при создании медицинских средств защиты в отношении COVID-19. Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (FDA) уведомило компанию Inovio о том, что имеет ряд вопросов до получения разрешения на проведение II фазы клинических исследований кандидатной вакцины INO-4800. Заявка на проведение клинических исследований нового лекарственного препарата в рамках фазы II/III приостановлена до октября 2020 г.⁴⁷

До конца 2020 г. компания AstraZeneca планирует выпустить 300 млн доз вакцины в США, 100 млн доз в Великобритании, а затем довести ежегодный выпуск до 2 млрд доз⁴⁸. Такое количество выпускаемой вакцины может быть рентабельным

³⁸ Gavi. The vaccine alliance. COVAX. <https://www.gavi.org/covax-facility>

³⁹ В Китае рассказали об испытании пяти вакцин от коронавируса. 15.05.2020. <https://ria.ru/20200515/1571527457.html>

⁴⁰ Вакцина против SARS-CoV-2 от Sinopharm демонстрирует многообещающие результаты. <https://gmpnews-ru.turbopages.org/gmpnews-ru/s/2020/06/vakcina-protiv-sars-cov-2-ot-sinopharm-demonstriruet-mnogoobeshhayushhie-rezultaty/>

⁴¹ A study to evaluate efficacy, safety, and immunogenicity of mRNA-1273 vaccine in adults aged 18 years and older to prevent COVID-19 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04470427). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04470427>

⁴² «АстраЗенека» и Оксфордский университет объявили о соглашении по разработке вакцины от COVID-19 <https://gmpnews-ru.turbopages.org/gmpnews-ru/s/2020/05/astrazeneka-i-oxfordskij-universitet-obyavili-o-soglashenii-po-razrabotke-vakciny-ot-covid-19/>

⁴³ В Институте исследования вакцин им. Эдварда Дженера начали испытания вакцины от коронавируса на людях. Успех не гарантирован, проблемы — почти наверняка. <https://www.bbc.com/russian/features-52395916>

⁴⁴ AZD1222 SARS-CoV-2 Vaccine. <https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/azd1222-sars-cov-2-vaccine>

⁴⁵ Британская AstraZeneca начала производство вакцины от COVID-19, не закончив тестирование. <https://us.vesti.news/britanskaya-astrazeneca-nachala-proizvodstvo-vaktsiny-2020060514480716.htm>

⁴⁶ Phillips N, Cyranoski D, Mallapaty S. A leading coronavirus vaccine trial is on hold: scientists react. Nature. 2020. <https://www.nature.com/articles/d41586-020-02594-w>

⁴⁷ <https://finance.rambler.ru/other/44919952-amerikanskaya-kompaniya-priostanovila-ispytaniya-vaktsiny-protiv-koronavirusa/>

⁴⁸ AstraZeneca advances response to global COVID-19 challenge as it receives first commitments for Oxford's potential new vaccine. <https://www.astrazeneca.com/media-centre/articles/2020/astrazeneca-advances-response-to-global-covid-19-challenge-as-it-receives-first-commitments-for-oxfords-potential-new-vaccine.html>

лишь в случае ее глобального использования. Поэтому финансирование разработок по созданию вакцин против COVID-19 можно рассматривать как борьбу за перспективный рынок сбыта препарата, который при возникновении новой пандемии заболевания будет востребован системой здравоохранения во всем мире.

В КНР и Великобритании уже анонсировано массовое производство данных вакцин.

Пострегистрационные клинические исследования вакцины «Спутник V» в России начаты 7 сентября 2020 г. В рандомизированных слепых исследованиях принимают участие 40000 человек старше 18 лет, случайным образом разделенных на 2 группы: опытную (30000 человек) и контрольную (10000 человек) с введением плацебо. Добровольцы распределены по следующим возрастным группам: 18–30, 31–40, 41–50, 51–60 лет и старше 60 лет. Каждый проходит наблюдение в течение 180 ± 14 сут после первой иммунизации. Проведено двукратное внутримышечное введение добровольцам вакцины (опытная группа) и плацебо (контрольная группа), интервал между введениями составил 21 ± 2 сут. Наблюдение за состоянием добровольцев проводится и будет проведено на 28 ± 2 , 42 ± 2 , и 180 ± 14 сут после первой иммунизации. У добровольцев будет проведено определение титра вируснейтрализующих антител (ВНА), титра антител к S-белку вируса SARS-CoV-2, интерферона γ , CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и динамика их изменений. Основным результатом проводимых исследований будет сравнение доли заболевших COVID-19 в опытной и контрольной группах. В связи с выходом второй волны пандемии COVID-19 с конца сентября 2020 г. на фазу экспоненциального роста имеется реальная возможность доказательства эффективности вакцины путем регистрации «значимых» различий между опытной и контрольной группами. Срок окончания исследований — 1 мая 2021 г.⁴⁹ Массовое производство вакцины «Спутник V» начато в конце сентября 2020 г. До настоящего времени у вакцинированных не отмечено ни одного случая тяжелой формы COVID-19. Согласно предварительным данным эффективность вакцины превышает 92%⁵⁰.

13 октября 2020 г. в Государственном реестре лекарственных средств зарегистрирована однокомпонентная пептидная вакцина против COVID-19 ЭпиВакКорона, разработанная в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора⁵¹. Предполагаемый способ применения вакцины — двукратное внутримышечное введение препарата в объеме 0,5 мл с интервалом 21 сут. I и II фазы клинических исследований были проведены с июля по сентябрь 2020 г. на 100 добровольцах. Следующую, третью фазу клинических исследований планируется проводить с ноября 2020 г. на 3000 добровольцев.

Заключение

На основании анализа информации о разработке и клинических исследованиях вакцин против COVID-19 в различных странах, достоинств и недостатков различных платформ для создания вакцин и возможном дизайне вакцин нового поколения сделан вывод о том, что вакцины против COVID-19 могут быть созданы как для иммунизации групп риска, так и для проведения массовой иммунизации с целью предотвращения повторной пандемии заболевания. С нашей точки зрения,

приоритетное положение при решении задачи по разработке вакцины, пригодной для проведения массовой иммунизации, в настоящее время занимает создание векторных рекомбинантных вакцин на основе аденовируса человека или обезьян, производство которых уже сейчас возможно в промышленных масштабах.

Вклад авторов. Г. Г. Онищенко — обоснование концепции проводимых исследований; Т. Е. Сизикова — анализ и обобщение данных литературы по созданию вакцин против COVID-19, обобщение опубликованных данных клинических исследований, написание текста рукописи; В. Н. Лебедев — анализ существующих технологических платформ для создания вакцин против COVID-19; С. В. Борисевич — анализ и обобщение данных литературы по COVID-19, разработка дизайна исследования, редактирование и переработка текста рукописи.

Authors' contributions. Gennadiy G. Onishchenko—substantiation of the study concept; Tatyana E. Sizikova—analysis and summarising of literature data on COVID-19 vaccine development, summarising of published data on clinical trials; writing the text; Vitaliy N. Lebedev—analysis of the existing technological platforms for COVID-19 vaccine development; Sergey V. Borisevich—analysis and summarising of literature data on COVID-19, elaboration of the study design, editing and revision of the paper.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. С. В. Борисевич является членом редакционного совета журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Sergey V. Borisevich is a member of the Editorial Council of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

- 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>
- Львов ДК, Альховский СВ, Колобухина ЛВ, Бурцева ЕИ. Этиология эпидемической вспышки COVID-19 в г. Ухань (провинция Хубэй, Китайская Народная Республика), ассоциированной с вирусом 2019-nCoV (*Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*): уроки эпидемии SARS-CoV. *Вопросы вирусологии*. 2020;65(1):6–15. [Lvov DK, Alkhovsky SV, Kolobukhina LV, Burtseva EI. Etiology of epidemic outbreaks COVID-19 in Wuhan, Hubei province, Chinese People Republic associated with 2019-nCoV (*Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus*, Subgenus *Sarbecovirus*): lessons of SARS-CoV outbreak. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, Russian Journal*. 2020;65(1):6–15 (In Russ.)] <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15>
- Fine P, Eames K, Heymann DL. «Herd immunity»: a rough guide. *Clin Infect Dis*. 2011;52(7):911–6. <https://doi.org/10.1093/cid/cir007>
- Holme P, Masuda N. The basic reproductive number as a predictor for epidemic outbreaks in temporal networks. *Plos*

⁴⁹ Clinical trial of efficacy, safety, and immunogenicity of Gam-COVID-Vac vaccine against COVID-19 (RESIST) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04530396). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04530396?term=vaccine&cond=covid-19&draw=3>

⁵⁰ Эффективность вакцины «Спутник V» против коронавируса составила 92% в ходе первого промежуточного анализа данных фазы III клинических исследований в РФ. [https://sputnikvaccine.com/rus/newsroom/pressreleases/effektivnost-vaktsiny-sputnik-v-protiv-koronavirusa-sostavila-92-v-khode-pervogo-promezhutochnogo-an/](https://sputnikvaccine.com/rus/newsroom/pressreleases/effektivnost-vaktsiny-sputnik-v-protiv-koronavirusa-sostavila-92-v-khode-pervogo-promezhutochnogo-analiza-dannykh-fazy-III-klinicheskikh-issledovaniy-v-RF)

⁵¹ <http://grls.rosminzdrav.ru>

- ONE. 2015;10(3):e0120567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120567>
5. Thanh Le T, Andreadakis Z, Kumar A, Gómez Román R, Tollefsen S, Saville M, Mayhew S. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(5):305–6. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00073-5>
 6. Feldmann H, Jones S, Klenk HD, Schnittler HJ. Ebola virus: from discovery to vaccine. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(8):677–85. <https://doi.org/10.1038/nri1154>
 7. Decaro N, Lorusso A. Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Vet Microbiol.* 2020;244:108693. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108693>
 8. Yip MS, Leung NH, Cheung CY, Li PH, Lee HH, Daëron M, et al. Antibody-dependent infection of human macrophages by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Virology.* 2014;11:82. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-82>
 9. Jaume M, Yip MS, Cheung CY, Leung HL, Li PH, Kien F, et al. Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus spike antibodies trigger infection of human immune cells via a pH- and cysteine protease-independent FcγR pathway. *J Virol.* 2011;85(20):10582–97. <https://doi.org/10.1128/JVI.00671-11>
 10. Cai Y, Zhang J, Xiao T, Peng H, Sterling SM, Walsh RM Jr, et al. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science.* 2020;369(6511):1586–92. <https://doi.org/10.1126/science.abd4251>
 11. Sohag AAM, Hannan MA, Rahman S, Hossain M, Hasan M, Khan MK, et al. Revisiting potential druggable targets against SARS-CoV-2 and repurposing therapeutics under preclinical study and clinical trials: a comprehensive review. *Drug Dev Res.* 2020. <https://doi.org/10.1002/ddr.21709>
 12. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubcova OV, Tukhvatullin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations two open non-randomized phase 1/2 studies from Russia. *Lancet.* 2020;396(10255):887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
 13. Zhu FC, Guan XH, Li YH, Huang JY, Jiang T, Hou LH, et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet.* 2020;396(10249):479–88. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)31605-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)31605-6)
 14. Yan-Jun Zhang, Gang Zeng, Hong-Xing Pan, Chang-Gui Li, Biao Kan, Ya-Ling Hu, et al. Immunogenicity and safety of a SARS-CoV-2 inactivated vaccine in healthy adults aged 18–59 years: report of the randomized, double-blind, and placebo-controlled phase 2 clinical trial. *medRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.07.31.20161216>
 15. Xia S, Duan K, Zhang Y, Zhao D, Zhang H, Xie Z, et al. Effect of an inactivated vaccine against SARS-CoV-2 on safety and immunogenicity outcomes: interim analysis of 2 randomized clinical trials. *JAMA.* 2020;324(10):951–60. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.15543>
 16. Zhu FC, Guan XH, Li YH, Huang JY, Jiang T, Hou LH, et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet.* 2020;396(10249):479–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31605-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31605-6)
 17. Jackson LA, Anderson EJ, Roupael NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, et al. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 — preliminary report. *N Engl J Med.* 2020;NEJMoa2022483. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022483>
 18. Mulligan MJ, Lyke KE, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Phase 1/2 study to describe the safety and immunogenicity of a COVID-19 RNA vaccine candidate (BNT162b1) in adults 18 to 55 years of age: interim report. *medRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.06.30.20142570>

Об авторах / Authors

Онищенко Геннадий Григорьевич, д-р мед. наук, проф., акад. РАН. *Gennadiy G. Onishchenko*, Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0135-7258>

Сизикова Татьяна Евгеньевна, канд. биол. наук. *Tatyana E. Sizikova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1817-0126>

Лебедев Виталий Николаевич, д-р биол. наук, проф. *Vitaliy N. Lebedev*, Dr. Sci. (Biol.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

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

Поступила 06.08.2020

После доработки 16.11.2020

Принята к публикации 04.12.2020

Received 6 August 2020

Revised 16 November 2020

Accepted 4 December 2020

Международные и отечественные нормативные рекомендации к разработке и регистрации вакцин против COVID-19 в условиях пандемии

А. А. Солдатов¹, Ж. И. Авдеева¹, В. П. Бондарев¹, В. А. Меркулов^{1,2}, В. Д. Мосягин¹, В. Б. Иванов¹, Д. В. Горенков^{1,*}, Л. М. Хантимирова¹

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

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

Развитие пандемии COVID-19 инициировало исследования по разработке вакцин против этой коронавирусной инфекции. ВОЗ и национальные регуляторные органы многих стран подготовили руководства, позволяющие ускорить разработку и регистрацию вакцин против COVID-19. Цель работы — анализ международных и отечественных регуляторных рекомендаций к разработке и ускоренной регистрации вакцин для профилактики коронавирусной инфекции COVID-19 в условиях пандемии, а также обобщение предварительных опубликованных результатов первых этапов доклинических и клинических исследований. В работе рассмотрены подходы к процедуре ускоренной регистрации лекарственных средств в условиях пандемии в Российской Федерации, ЕС и США. Представлены регуляторные требования к качеству, доклиническим и клиническим исследованиям вакцин для профилактики COVID-19. Описаны первые результаты разработки вакцин против COVID-19. Показано, что, согласно регуляторным документам указанных стран, возможно ускорение регистрационного процесса за счет сокращения сроков экспертизы качества, эффективности и безопасности вакцины. Также возможна так называемая регистрация на условиях, при этом вакцина может быть зарегистрирована на основании неполных доклинических и клинических исследований при условии, что после регистрации все исследования будут выполнены в полном объеме. Представлены обобщенные результаты клинических исследований вакцин против COVID-19. Единичные опубликованные предварительные результаты первых этапов клинических исследований вакцин против COVID-19 продемонстрировали их хорошую переносимость, безопасность и иммуногенность. При исследовании вакцин на основе аденовируса установлено, что до исследования практически у половины добровольцев определялись высокие титры антител к аденовирусу, что сопровождалось более мягким развитием побочных реакций и низкой иммуногенностью. При этом у лиц старшей возрастной группы (45–60 лет) иммунный ответ был слабее, чем в группе лиц младше 45 лет. Результаты анализа нормативных требований, регламентирующих разработку и регистрацию вакцин против COVID-19 в условиях пандемии, а также международных и национальных нормативных подходов для разработки и регистрации вакцин могут послужить основой при разработке отечественных требований для вакцины против COVID-19 в условиях пандемии.

Ключевые слова: пандемия COVID-19; вакцины; вирус SARS-CoV-2; нормативные требования; ускоренная регистрация вакцин; регистрация вакцин против COVID-19

Для цитирования: Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Бондарев ВП, Меркулов ВА, Мосягин ВД, Иванов ВБ, Горенков ДВ, Хантимирова ЛМ. Международные и отечественные нормативные рекомендации к разработке и регистрации вакцин против COVID-19 в условиях пандемии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(4):228–244. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-228-244>

* **Контактное лицо:** Горенков Дмитрий Витальевич; diyarl@ya.ru

Russian and International Regulatory Recommendations for the Development and Marketing Authorisation of COVID-19 Vaccines in the Context of the Pandemic

A. A. Soldatov¹, Zh. I. Avdeeva¹, V. P. Bondarev¹, V. A. Merkulov^{1,2}, V. D. Mosyagin¹, V. B. Ivanov¹, D. V. Gorenkov^{1,*}, L. M. Khantimirova¹

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

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

The progress of the COVID-19 pandemic initiated research to develop vaccines against this novel coronavirus infection. The WHO and national regulatory authorities in many countries have elaborated guidelines to speed up the development and authorisation of COVID-19 vaccines. The aim of the study was to analyse international and Russian regulatory recommendations for the development and fast-track approval of COVID-19 vaccines

in the context of the pandemic, as well as to summarise the preliminary published results of the first stages of preclinical and clinical studies. The paper analyses approaches to fast-track approval of medicines in the face of the pandemic in Russia, the European Union, and the United States. It summarises regulatory requirements for the quality of COVID-19 vaccines, as well as for preclinical, and clinical studies. It describes the first results of COVID-19 vaccine development. The analysed regulatory documents allow for accelerated authorisation due to reduction of time spent on evaluation of vaccine quality, safety, and efficacy. Another option is the so-called conditional marketing authorisation when a vaccine is registered based on incomplete preclinical and clinical data provided that all the studies will be completed after the vaccine authorisation. The paper summarises the results of clinical trials of COVID-19 vaccines. The few published preliminary results of the first phases of COVID-19 vaccine clinical trials demonstrate the vaccines' good tolerability, safety, and immunogenicity. Evaluation of adenovirus-based vaccines showed that almost half of the volunteers had high antibody titers to adenovirus before the study, which resulted in milder adverse reactions and low immunogenicity. In addition, the immune response was weaker in the older group of subjects (45–60 years) as compared to the subjects younger than 45 years. The results of the analysis of regulatory requirements for the development and marketing authorisation of COVID-19 vaccines in the context of the pandemic, as well as of national and international regulatory approaches to vaccine development and authorisation can be used as a basis for the development of Russian requirements for COVID-19 vaccines in the context of the pandemic.

Key words: COVID-19 pandemic; vaccines; SARS-CoV-2 virus; regulatory requirements; fast-track approval of vaccines; COVID-19 vaccine authorisation

For citation: Soldatov AA, Avdeeva ZhI, Bondarev VP, Merkulov VA, Mosyagin VD, Ivanov VB, Gorenkov DV, Khantimirova LM. Russian and international regulatory recommendations for the development and marketing authorisation of COVID-19 vaccines in the context of the pandemic. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):228–244. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-4-228-244>

* **Corresponding author:** Dmitry V. Gorenkov; diyarl@ya.ru

В конце 2019 г. было установлено, что причиной острого тяжелого респираторного синдрома (позднее обозначенного как заболевание COVID-19) является коронавирус, впоследствии получивший название SARS-CoV-2. 11 марта 2020 г. ВОЗ объявила о начале пандемии COVID-19, что инициировало активный поиск эффективных лекарственных средств для борьбы с инфекцией [1]. При этом более чем вековой опыт борьбы с инфекционными заболеваниями показывает, что наиболее эффективным и безопасным методом прекращения и предотвращения эпидемий является вакцинация.

Разработка, контроль качества, проведение доклинических и клинических исследований и процедура регистрации вакцин, как и всех биологических лекарственных препаратов, существенно отличаются от аналогичных процедур для лекарственных препаратов, получаемых на основе химического синтеза. В отличие от последних, вакцины представляют собой белковые и (или) белково-полисахаридные соединения, получаемые с использованием биологических, биотехнологических или генетических методов синтеза целевого антигена. Кроме того, вакцины должны содержать в своем составе вспомогательные вещества, позволяющие поддерживать стабильность (конформационную структуру белковых молекул) действующего вещества. Также в состав вакцин могут быть включены адъюванты для усиления иммунного ответа на антиген. Учитывая данные особенности, для регистрации вакцин требуется проведение обширных доклинических и клинических исследований для подтверждения их эффективности и безопасности.

Многие производители разработали универсальные, так называемые производственные платформы, позволяющие на основе единых технологических подходов создавать антигены для разных вакцин. Однако будет ли созданная на основе уже разработанной производственной платформы вакцина против COVID-19 обладать достаточной эффективностью и безопасностью — заранее спрогнозировать сложно.

Основные проблемы при разработке вакцины против COVID-19 обусловлены, в первую очередь, тем, что в настоящее время имеется недостаточно информации о самом вирусе, патогенезе инфекционного процесса, механизмах развития иммунного ответа и длительности его сохранения, участии в иммунном ответе на вакцину гуморального и клеточного звеньев иммунитета. Несмотря на данные особенности, именно с созданием вакцин против COVID-19 связаны надежды на прекращение пандемии, при этом массовый выпуск вакцины необходимо наладить в очень короткие сроки.

Цель работы — анализ международных и отечественных регуляторных рекомендаций к разработке и ускоренной регистрации вакцин для профилактики коронавирусной инфекции COVID-19 в условиях пандемии, а также обобщение предварительных опубликованных результатов первых этапов доклинических и клинических исследований.

Документы, регламентирующие процедуры регистрации вакцин против COVID-19 в условиях пандемии

В настоящее время в мире проводится большое количество исследований по разработке вакцин против COVID-19 с использованием различных технологий (РНК-вакцины, ДНК-вакцины, белковые, с использованием наночастиц и адъювантов и др.¹). Поэтому очень сложно подготовить единые нормативные требования, учитывающие особенности разных видов вакцин.

С учетом сложившейся обстановки ведущие международные и национальные регуляторные системы мира, в первую очередь ВОЗ, ЕМА, FDA и др., провели критический анализ существующих нормативных руководств и рекомендаций и подготовили документы, позволяющие ускорить этапы разработки и регистрации вакцин против COVID-19.

В Российской Федерации в дополнение к уже имеющимся документам принято Постановление Правительства № 441².

¹ Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>

² Постановление Правительства Российской Федерации от 03.04.2020 № 441 (ред. от 01.09.2020) «Об особенностях обращения лекарственных препаратов для медицинского применения, которые предназначены для применения в условиях угрозы возникновения, возникновения и ликвидации чрезвычайной ситуации и для организации оказания медицинской помощи лицам, пострадавшим в результате чрезвычайных ситуаций, предупреждения чрезвычайных ситуаций, профилактики и лечения заболеваний, представляющих опасность для окружающих, заболеваний и поражений, полученных в результате воздействия неблагоприятных химических, биологических, радиационных факторов».

Этим документом утверждены «Особенности обращения лекарственных препаратов для медицинского применения...» (Постановление), позволяющие сократить некоторые этапы разработки и регистрации препаратов (в том числе и вакцин) в условиях пандемии. Следует отметить, что отечественные нормативные требования по принципиальным вопросам не отличаются от национальных рекомендаций других стран и международных организаций.

В Постановлении прежде всего сокращены сроки, установленные для процедуры регистрации Федеральным законом № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», в частности «государственная регистрация лекарственного препарата осуществляется Министерством в срок, не превышающий 20 рабочих дней со дня поступления заявления и документов»³. Причем регистрация препаратов, уже одобренных FDA и EMA, осуществляется в течение 5 дней. В экспертном учреждении экспертная оценка качества препарата, его эффективности и безопасности должна проводиться в течение 15 дней.

Некоторые доклинические исследования могут быть сокращены на предрегистрационном этапе и в достаточном объеме выполнены параллельно с клиническими исследованиями⁴. Согласно данному документу, возможна регистрация вакцины на основании неполных клинических исследований на «особых условиях». В данном случае «особые условия» означают возможность проведения поздних фаз клинических исследований в полном объеме в пострегистрационном периоде.

В EMA существуют несколько процедур ускоренного лицензирования лекарственных средств. Для разработки и лицензирования вакцин против COVID-19 наиболее оптимально подходит и рекомендуется EMA программа «Приоритетные лекарственные средства» (PRIME)⁵. Данная программа позволяет лицензировать препараты на основании неполного объема доклинических и клинических исследований, которые должны быть проведены в полном объеме после получения лицензии.

Учитывая активное развитие и социальное значение пандемии COVID-19, несмотря на наличие программы ускоренного лицензирования в рамках EMA, для координации и быстрого реагирования по вопросам нормативных требований в EMA была создана целевая группа — COVID-ETF⁶. Основной целью деятельности COVID-ETF является более быстрое продвижение препаратов и вакцин против COVID-19. Одной из приоритетных задач COVID-ETF является раннее научное консультирование по вопросам разработки вакцин. Подразделениями EMA (Рабочей группой по научным консультациям (SAWP) и Комитетом по лекарственным препаратам (CHMP), в том числе при участии группы COVID-ETF), был разработан документ по ускоренной процедуре экспертизы и регистрации препаратов и вакцин против COVID-19⁷. Документ дополняет другие, уже применяемые нормативные требования.

В документе EMA прописаны следующие процедуры, позволяющие ускорить разработку и лицензирование вакцин: ускоренное и регулярное научное консультирование, консуль-

тирование по вопросам исследований среди детей, непрерывная оценка данных, процедура лицензирования, продление лицензии и показаний к применению, применение лекарственного препарата в неотложных ситуациях и др.⁸

Для ускорения процедуры научного консультирования EMA предложены следующие возможности: для разработчиков не существует заранее установленных сроков подачи заявок на консультирование; научная консультация бесплатна и срок выполнения ответа на письмо заявителя экспертами EMA составляет 20 дней (в обычных условиях срок составляет 40 или 70 дней). Подготовка ответа экспертами EMA на вопросы, касающиеся плана педиатрического исследования, сокращается до 20 дней (в обычных условиях — 120 дней)⁹.

Следует отметить, что ответ экспертов EMA на запрос производителя (то есть научное консультирование) не является предварительной оценкой данных, а скорее помогает при планировании дальнейших исследований.

В чрезвычайных ситуациях EMA может дать разрешение на так называемую процедуру непрерывной оценки данных (rolling review) до официальной заявки на регистрацию. Данная процедура позволяет экспертам EMA проводить оценку (экспертизу) данных по мере их готовности. Это позволяет значительно ускорить подготовку окончательного заключения для выдачи лицензии на продажу препарата. Данная процедура может быть инициирована только группой COVID-ETF. Заявитель направляет готовые материалы в формате общего технического документа (OTD).

Если заявитель не использовал процедуру непрерывной оценки данных, то он подает заявку на лицензирование препарата, но срок рассмотрения заявки сокращается с 210 до 150 дней. Причем специалисты EMA могут (если это возможно) провести экспертизу представленных для лицензирования материалов в еще более короткий срок¹⁰.

В FDA, как и в EMA, разработано несколько процедур ускоренной регистрации лекарственных средств в особых ситуациях. Если доклинические и клинические исследования при разработке вакцины против COVID-19 выполнены в неполном объеме, то FDA рекомендует лицензировать вакцину по процедуре «Регистрация лекарственных препаратов и медицинских изделий в условиях чрезвычайной ситуации и связанные с регистрацией регуляторные органы» (Emergency use authorization of medical products and related authorities, процедура EUA)¹¹. Процедура лицензирования EUA в условиях чрезвычайной ситуации позволяет получить лицензию с ограниченным сроком действия (например, на 1 год). Если в течение года действия лицензии EUA заявителем представлены все результаты исследований в полном объеме, то он может получить обычную лицензию на производство и продажу биологического препарата (BLA). Если в течение года по обоснованным обстоятельствам заявитель не смог в полном объеме собрать необходимый материал, лицензия EUA может быть продлена еще на определенное время.

³ Там же.

⁴ Там же.

⁵ European Medicines Agency Guidance for applicants seeking access to PRIME scheme (EMA/191104/2015). EMA; 2018.

⁶ Mandate, objectives and rules of procedure of the COVID-19 EMA pandemic Task Force (COVID-ETF) (EMA/166423/2020). EMA; 2020.

⁷ EMA initiatives for acceleration of development support and evaluation procedures for COVID-19 treatments and vaccines (EMA/213341/2020). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/ema-initiatives-acceleration-development-support-evaluation-procedures-covid-19-treatments-vaccines_en.pdf

⁸ Там же.

⁹ Там же.

¹⁰ Там же.

¹¹ Emergency use authorization of medical products and related authorities. Guidance for industry and other stakeholders. FDA; 2017. <https://www.fda.gov/media/97321/download>

Международные требования к вакцинам против COVID-19, разрабатываемым и применяемым в условиях пандемии

Для стран ЕС и большинства стран мира (за исключением США и стран, которые взяли за основу принципы FDA), основными документами, регламентирующими доклинические (включая вопросы качества и производства) и клинические исследования новых вакцин, являются два документа ВОЗ: «Руководство по проведению доклинической оценки вакцин» и «Руководство по клинической оценке вакцин: регуляторные ожидания»¹². Учитывая тот факт, что эффективность вакцин оценить достаточно сложно (например, если вакцина разрабатывается не в эндемическом очаге инфекции), больше внимания в данных рекомендациях уделено оценке безопасности. Данные документы касаются общих вопросов разработки безопасных и эффективных препаратов. Более подробные рекомендации, посвященные вопросам безопасности и эффективности, прописаны в отдельных документах ВОЗ для разработки конкретных вакцин (например, против полиомиелита, гриппа, лихорадки Эбола и др.).

С самого начала появления информации о первых выявленных случаях COVID-19 ВОЗ проводила активную работу по предупреждению распространения инфекции в мире, а затем по борьбе с пандемией. Одной из основных задач деятельности ВОЗ является гармонизация для всех стран подходов, касающихся производства, доклинических и клинических исследований и условий регистрации лекарственных средств. Учитывая особенности возбудителя COVID-19 и эпидемического процесса, после ряда консультаций с ведущими специалистами мира, в апреле 2020 г. ВОЗ были подготовлены общие требования к вакцине против COVID-19 (целевой профиль) (WHO Target Product Profiles for COVID-19 Vaccines)¹³ (табл. 1). В мире постоянно появляются новые виды разрабатываемых вирусных вакцин (векторные, ДНК-вакцины, РНК-вакцины, с использованием адъювантов и наночастиц и др.), поэтому в документе указаны общие требования к параметрам, характеризующим профиль вакцины против COVID-19 при применении в период эпидемии и неэпидемический период.

Регламентирование качества вакцин против COVID-19

В регистрационном досье вакцины против COVID-19, как и для любой другой вакцины, должны быть представлены в полном объеме характеристика физико-химических свойств вакцины и методы контроля качества, которые должны соответствовать нормативным требованиям, предъявляемым к вакцинам. При этом необходимо надлежащим образом охарактеризовать не только сам препарат, но и производственный процесс его получения, с указанием и характеристикой критических точек производства, представить материалы валидации этапов производственного процесса и методов контроля качества. Производственный процесс получения вакцины должен осуществляться в соответствии с действующими стандартами надлежащей производственной практики (GMP).

Основные общие рекомендации, касающиеся вопросов производства и оценки качества вакцин, описаны в документе ВОЗ «Руководство по проведению доклинической оценки вакцин»¹⁴. Учитывая сложность и особенности разработки биологических препаратов, ВОЗ был подготовлен ряд документов по некоторым конкретным вопросам качества и производства, например стабильности вакцин, особенностям вакцин на основе ДНК и др. Нормативные документы ВОЗ, касающиеся вопросов производства и оценки качества, которые могут использоваться при разработке вакцин против COVID-19, указаны на рисунке 1. При этом при разработке вакцин против COVID-19 может быть полезна информация, представленная в рекомендациях для оценки качества, безопасности и эффективности вакцин, например, вакцин против вируса Эбола и других вакцин (рис. 1). Следует отметить, что развитие пандемии инициировало пересмотр некоторых документов ВОЗ, например в настоящее время уже подготовлен обновленный проект руководства по обеспечению качества, безопасности и эффективности ДНК-вакцин¹⁵.

Основные требования, касающиеся физико-химических и биологических свойств (качества) вакцин, представлены в фармастатьях (монографиях) национальных и международных фармакопей. Для более быстрой разработки вакцин против COVID-19 некоторые национальные и международные фармакопейные комитеты сделали доступными (бесплатными) на период пандемии, вызванной COVID-19, последние редакции фармакопей (в частности, Европейской и Британской)¹⁶. Кроме того, сотрудники данных фармакопейных комитетов подготовили указания, которые позволяют значительно облегчить поиск необходимой информации в фармакопее. В частности, в Европейской фармакопее специально для заинтересованных лиц, занимающихся разработкой вакцин против COVID-19, составлена сводная таблица с перечнем фармакопейных статей, с информацией о типах вакцин или соответствующих вакцинных платформах (например, живая аттенуированная вирусная вакцина, рекомбинантные вакцины с вирусным вектором). Причем список монографий не является исчерпывающим и регулярно пересматривается и обновляется по мере появления новой информации.

Крайне сложно на этапе оценки/характеристики физико-химических и биологических свойств (качества) сократить сроки разработки вакцины, однако это возможно при использовании универсальной платформы для получения вакцин. Разработка вакцины против COVID-19 может быть ускорена на основе информации (результатов исследований), полученных при разработке других зарегистрированных вакцин на той же технологической платформе. Аналогичным образом, если планируется выпускать препарат на производственной платформе, на которой уже освоен выпуск зарегистрированных вакцин, то соответствующие данные, полученные для этих вакцин, при должном обосновании могут быть использованы для характеристики отдельных этапов производства и методов контроля¹⁷. В подобных ситуациях для разработки новой вакцины может

¹² WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO Technical Report Series, No. 927, 2005.

Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 924. WHO Technical Report Series, No. 1004, 2017.

¹³ WHO target product profiles for COVID-19 vaccines. <https://www.who.int/publications/m/item/who-target-product-profiles-for-covid-19-vaccines>

¹⁴ WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO Technical Report Series, No. 927, 2005.

¹⁵ Guidelines for assuring the quality, safety, and efficacy of plasmid DNA vaccines. Proposed revision of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 941. Post ECBS version/1 September 2020. Expert committee on biological standardization. WHO; 2020. <https://www.who.int/publications/m/item/DNA-post-ECBS-1-sept-2020>

¹⁶ Vaccines against COVID-19. EDQM provides COVID-19 vaccine developers with free access to quality standards applicable in Europe. Swissmedic; 2020. https://www.swissmedic.ch/swissmedic/en/home/news/coronavirus-covid-19/impfstoffe_covid-19.html

¹⁷ Development and licensure of vaccines to prevent COVID-19. Guidance for industry (FDA-2020-D-1137). CBER/FDA; 2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-and-licensure-vaccines-prevent-covid-19>

Таблица 1. Целевой профиль вакцины против COVID-19 для активной иммунизации в период эпидемии и для долгосрочной профилактики лиц, подверженных высокому постоянному риску заражения COVID-19¹⁸
Table 1. Target profile of COVID-19 vaccine for active immunisation during an epidemic and for long-term protection of those at high ongoing risk of COVID-19¹⁸

Параметры Vaccine characteristic	Варианты рекомендаций Recommendations	
	оптимальный preferred	критический или минимально допустимый critical or minimal
Показания к применению Indication for use	<i>В период эпидемии:</i> для активной иммунизации лиц из групп риска, в эпидемическом очаге с целью профилактики COVID-19. <i>Долгосрочно:</i> для активной иммунизации лиц из групп риска <i>Outbreak:</i> for active immunisation of persons at high risk in the area of an on-going outbreak for the prevention of COVID-19. <i>Long-term:</i> for active immunisation of at-risk persons to prevent COVID-19	<i>В период эпидемии:</i> для активной иммунизации лиц из групп риска, в эпидемическом очаге с целью профилактики COVID-19. <i>Долгосрочно:</i> для активной иммунизации лиц из групп риска <i>Outbreak:</i> for active immunisation of persons at high risk in the area of an on-going outbreak for the prevention of COVID-19. <i>Long-term:</i> for active immunisation of at-risk persons to prevent COVID-19
Противопоказания Contraindication	Не имеются None	Приемлемы отдельные противопоказания (например, для лиц с ослабленным иммунитетом) Some contraindications (e.g., immunocompromised) may be acceptable
Целевая популяция Target population	Все возрастные группы, беременные и кормящие женщины All ages. Suitable for administration to pregnant and lactating women	Взрослые, в том числе пожилые Adults, including elderly
Безопасность, реактогенность Safety, reactogenicity	Допустимы только легкие, преходящие нежелательные явления (НЯ), связанные с вакцинацией. Недопустимы серьезные НЯ Only mild, transient adverse events (AEs) related to vaccination are acceptable. No serious AEs are acceptable	<i>В период эпидемии:</i> безопасность и реактогенность вакцины превышают риски по безопасности ^a . <i>Долгосрочно:</i> только легкие, преходящие НЯ <i>Outbreak:</i> safety and reactogenicity whereby vaccine benefits outweigh safety risks ^a . <i>Long-term:</i> only mild, transient AEs
Эффективность Efficacy	Эффективность не менее 70% (стойкие результаты в популяции пожилых лиц), при этом нижняя граница доверительного интервала может быть ниже ^b . <i>В период эпидемии:</i> быстрое формирование защитного иммунитета (менее 2 недель). <i>Долгосрочно:</i> быстрое (менее 2 недель) формирование защитного иммунитета не требуется At least 70% efficacy (with consistent results in the elderly), and the lower confidence limit of the efficacy estimate could be lower ^b . <i>Outbreak:</i> rapid onset of protection (less than 2 weeks). <i>Long-term:</i> rapid onset of protection (less than 2 weeks) is not required	Четкая демонстрация эффективности (в популяции), в идеале на уровне 50%, при этом нижняя граница доверительного интервала может быть ниже ^b . Если регистрация осуществляется на основании неполных данных эффективности, данные должны быть получены в пострегистрационном периоде Clear demonstration of efficacy (on population basis) ideally with 50% point estimate, and the lower confidence limit of the efficacy estimate could be lower ^b . If regulatory authorisation is provided with incomplete efficacy data, the data are to be generated during use
Режим дозирования Dose regimen	<i>В период эпидемии:</i> крайне предпочтительно одноразовое введение; если на текущий момент реализуемо только двукратное введение, то оно возможно. <i>Долгосрочно:</i> предпочтительна более низкая частота (ежегодно или реже) бустерных введений <i>Outbreak:</i> strong preference for single-dose, but if 2-dose regimen is the only one feasible, it is also acceptable. <i>Long-term:</i> lower frequency (yearly or less) of booster doses is preferred	<i>В период эпидемии:</i> допустимо не более чем двукратное введение. <i>Долгосрочно:</i> разрешены бустерные введения <i>Outbreak:</i> no more than 2-dose regimen. <i>Long-term:</i> booster doses are permitted
Длительность защиты Durability of protection	Не менее 1 года At least 1 year	Не менее 6 месяцев ^c At least 6 months ^c
Путь введения Route of administration	<i>В период эпидемии:</i> предпочтительно непарентеральное введение с целью ускорения процесса введения и устранения возможных логистических проблем. <i>Долгосрочно:</i> допустим любой путь введения <i>Outbreak:</i> Non-parenteral is preferred for ease of rapid administration and other logistical issues. <i>Long-term:</i> any route of administration is acceptable	Допустим любой путь введения при условии безопасности и эффективности вакцины Any route of administration is acceptable, if the vaccine is safe and effective

¹⁸ WHO target product profiles for COVID-19 vaccines. <https://www.who.int/publications/m/item/who-target-product-profiles-for-covid-19-vaccines>

Параметры Vaccine characteristic	Варианты рекомендаций Recommendations	
	оптимальный preferred	критический или минимально допустимый critical or minimal
Стабильность вакцин и хранение Vaccine stability and storage	Крайне предпочтительны положительная температура хранения и высокая термостабильность, что позволит значительно расширить доступность вакцины для населения. Возможность и намерение производителя использовать термоиндикатор на первичной упаковке препарата Higher storage temperatures and higher thermostability will greatly enhance vaccine distribution and availability, and are thus strongly preferred. Vaccine vial monitor (VVM): proof of feasibility and intent to apply a VVM to the primary container	<i>В период эпидемии:</i> срок годности не менее 12 месяцев при температуре минус (60–70) °C ^d и подтверждение стабильности не менее чем в течение 2 недель при 2–8 °C. <i>Долгосрочно:</i> хранение при температуре минус 20 °C или выше. Возможность и намерение производителя использовать термоиндикатор на первичной упаковке препарата <i>Outbreak:</i> shelf life of at least 12 months as low as (60–70) °C ^d , and demonstration of at least 2-week stability at 2–8 °C. <i>Long-term:</i> storage at –20 °C or higher. Proof of feasibility and intent to apply a VVM to the primary container
Совместимость с другими вакцинами Co-administration with other vaccines	<i>В период эпидемии:</i> несовместима с другими вакцинами. <i>Долгосрочно:</i> предпочтительна возможность совместимости с другими вакцинами (например, от гриппа, полиомиелита, кори, пневмококковой) <i>Outbreak:</i> stand-alone product <i>Long-term:</i> potential for co-administration with other vaccines (e.g., influenza, polio, measles, pneumococcal) is preferred	Несовместима с другими вакцинами Stand-alone product
Форма выпуска Presentation	<i>В период эпидемии:</i> предпочтительна многодозовая упаковка для облегчения применения во время кампании по вакцинации. <i>Долгосрочно:</i> допустимы многодозовые или однодозовые упаковки. Максимальный объем для парентерального введения — 0,5 мл <i>Outbreak:</i> availability of multi-dose presentation is generally preferred for use in campaigns. <i>Long-term:</i> mono-dose or multi-dose presentations are acceptable. Maximum parenteral dose volume: 0.5 mL	Допустимы многодозовые или однодозовые упаковки. Максимальный объем для парентерального введения — 1,0 мл Mono-dose or multi-dose presentations are acceptable. Maximum parenteral dose volume: 1.0 mL

^a Соотношение «польза–риск» может зависеть от многих факторов (в первую очередь от возраста вакцинируемых и др.), при этом необходимо учитывать возможность эффекта усиления заболевания.

^b В качестве конечных точек могут использоваться выявленные случаи заболевания, тяжелые формы болезни, выявленные случаи вирусывыделения и случаи передачи инфекции.

^c Если длительность защиты не может быть продемонстрирована на ранних фазах клинических исследований, она может быть подтверждена на последующих этапах клинических исследований, а также предоставлением дополнительных данных доклинических исследований и т. д.

^d Необходимость хранения лекарственного средства при температуре ниже минус 20 °C потребует дополнительной инфраструктуры и может затруднить транспортирование и дистрибуцию вакцины.

^e Benefit/risk may depend on many factors (primarily, on age). Benefit/risk assessment should take potential for enhanced disease into account.

^f Endpoint may be assessed versus disease, severe disease, and shedding/transmission.

^g If the durability of protection cannot be demonstrated in initial phases of clinical studies, it could be supported by follow-on studies, additional preclinical data, etc.

^d Storage at temperatures below –20 °C would require additional infrastructure and may impede transportation and distribution of vaccine.

быть использована только та информация, которая была получена ранее при разработке зарегистрированной вакцины на основании результатов полной стандартной оценки эффективности и безопасности.

Доклинические исследования вакцин против COVID-19

Основной целью доклинических исследований вакцины против COVID-19 является оценка безопасности и иммуногенности вакцины *in vitro* и *in vivo* методами, в процессе которых необходимо определить дозу вакцины для первого применения у человека, путь введения и схему введения для обоснования разрешения на проведение клинических исследований. Объем и программа клинических исследований зависят в первую очередь от особенности вакцины и информации об основных

свойствах аналогичных вакцин. Для получения разрешения на проведение клинических исследований необходимо представить результаты доклинических исследований острой и хронической токсичности, реактогенности и местной переносимости в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики (GLP)¹⁹.

Вне зависимости от того, для профилактики какой инфекции разрабатывается вакцина, ко всем новым вакцинам предъявляются единые требования, касающиеся объема и программы доклинических исследований вакцин. В большинстве стран мира основным общим документом, регламентирующим разработку и оценку качества вакцин, является «Руководство по проведению доклинической оценки вакцин», подготовленное ВОЗ²⁰. Более подробное описание

¹⁹ Guidance on clinical trial management during the COVID-19 pandemic. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/compliance/good-clinical-practice#guidance-on-clinical-trial-management-during-the-covid-19-pandemic-section>

OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997). OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 1 (ENV/MC/CHEM(98)17). OECD; 1998. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem\(98\)17&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem(98)17&doclanguage=en)

²⁰ WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO Technical Report Series, No. 927, 2005.

Документы, посвященные общим вопросам Documents covering general issues	Annex 1. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO Technical Report Series, No. 927, 2005
	Annex 3. Guidelines on stability evaluation of vaccines. WHO Technical Report Series, No. 962, 2011
	Annex 2. Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines. WHO Technical Report Series, No. 987, 2014
	Annex 2. WHO good manufacturing practices for biological products. Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 822. WHO Technical Report Series, No. 999, 2016
	Annex 2. Guidelines for independent lot release of vaccines by regulatory authorities. WHO Technical Report Series, No. 978, 2013
	Annex 9. Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 924. WHO Technical Report Series, No. 1004, 2017
Документы, посвященные определенным видам вакцин или технологиям Documents covering specific types of vaccines or technologies	Annex 3. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 878. WHO Technical Report Series, No. 978, 2013
	Annex 1. Guidelines for assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines. WHO Technical Report Series, No. 941, 2007
Документы, посвященные конкретным вакцинам Documents covering specific vaccines	Annex 4. Guidelines on the quality, safety and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, No. 814. WHO Technical Report Series, No. 987, 2014
	Annex 2. Guidelines on the quality, safety and efficacy of Ebola vaccines. WHO Technical Report Series, No. 1011, 2018
	Guidelines on the quality, safety and efficacy of respiratory syncytial virus vaccines. WHO, 2019 (Post ECBS Version / 11 November 2019)
	Annex 2. Guidelines on regulatory preparedness for human pandemic influenza vaccines (Adopted 2007). WHO Technical Report Series, No. 963, 2011
	Annex 7. Guidelines on regulatory preparedness for provision of marketing authorization of human pandemic influenza vaccines in non-vaccine-producing countries. WHO Technical Report Series, No. 1004, 2017
	Annex 3. Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral). WHO Technical Report Series, No. 941, 2007
	Annex 5. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated yellow fever vaccines. Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 872 and of the Amendment to that annex in WHO Technical Report Series, No. 964, 2012. WHO Technical Report Series, No. 978, 2013
	Annex 2. Guidelines on the quality, safety and efficacy of dengue tetravalent vaccines (live, attenuated). Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 932. WHO Technical Report Series, No. 979, 2013
Annex 7. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of Japanese encephalitis vaccines (live, attenuated) for human use. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, No. 910. WHO Technical Report Series, No. 980, 2014	

Рис. 1. Нормативные рекомендации, которые могут быть использованы при разработке вакцин против COVID-19.
Fig. 1. Regulatory guidelines that can be used in the development of COVID-19 vaccines.

особенностей доклинических исследований вакцин против COVID-19 содержится в рекомендациях FDA Development and licensure of vaccines to prevent COVID-19²¹. Данные рекомендации были опубликованы в июне 2020 г. с целью помочь разработчикам в создании вакцин против нового коронавируса в условиях пандемии COVID-19. В документе большое внимание уделено вопросам доклинических исследований. С целью ускорения процесса для получения разрешения на клиническое исследование вакцины (в случае использования производственной платформы, на которой уже выпускаются зарегистрированные вакцины) разработчик может представить результаты ограниченных доклинических исследований, при этом обязательно должны быть представлены исследования острой токсичности. В данном случае для обоснования безопасности вакцины против COVID-19 с целью получения разрешения на проведение клинических исследований могут быть использованы результаты изучения других вакцин (полученных на данной платформе), например характеристики

препарата и оценка токсичности (изучение токсичности при повторном введении, изучение биораспределения и др.).

Если в исследованиях аналогичных вакцин получены результаты, которые не могут достоверно охарактеризовать свойства разрабатываемой вакцины, то это может потребовать проведения дополнительных исследований. Согласно руководству FDA, дополнительные доклинические исследования могут проводиться параллельно с клиническими исследованиями. При этом разработчик должен в срок не позднее 120 дней от начала клинического исследования представить окончательные результаты соответствующих доклинических исследований. До начала клинических исследований разработчикам рекомендуется проведение исследований онтогенетической и репродуктивной токсичности (developmental and reproductive toxicity, DART). Но в качестве альтернативы разработчики могут представить имеющиеся данные исследований DART с аналогичным продуктом, полученные с использованием сопоставимой технологии/платформы²².

²¹ Development and licensure of vaccines to prevent COVID-19. Guidance for industry (FDA-2020-D-1137). CBER/FDA; 2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-and-licensure-vaccines-prevent-covid-19>

²² Там же.

В соответствии с руководством FDA при разработке принципиально новой вакцины и отсутствии данных о ее биологическом распределении требуется изучение биораспределения на животных. Данные исследования следует проводить, если существует вероятность изменения механизма инфицирования и тканевого тропизма или если используется новый способ введения и новый состав препарата²³.

Требования для изучения иммуногенности кандидатов в вакцины против COVID-19 на этапе доклинических исследований те же самые, что и для всех других вирусных вакцин. Исследования должны быть проведены на релевантных видах животных (реагирующих на выбранный антиген вакцины против COVID-19). Выбор необходимых для исследования иммунологических показателей осуществляется с учетом особенности вакцины и предполагаемого механизма действия. Исследования должны включать количественную оценку показателей гуморального и клеточного иммунного ответа и характеристику их функциональной активности для каждого из включенных (в вакцину) антигенов COVID-19. Функциональную активность антител следует оценивать *in vitro* в реакции нейтрализации с использованием вируса дикого типа или вируса псевдовируса. Используемые методы исследования иммуногенности должны быть обоснованы.

На данный момент одна из основных проблем при проведении доклинических исследований вакцины против COVID-19 связана с теоретически возможным риском усиления развития респираторного заболевания (ERD), связанного с вакциной против COVID-19. Данная озабоченность основана на результатах доклинических исследований кандидатов в вакцины для лечения инфекций, вызванных коронарными вирусами SARS-CoV и MERS-CoV. Животным вводили вакцины против SARS-CoV и MERS-CoV, а затем инфицировали их вирусами дикого типа. У животных было зарегистрировано развитие иммунопатологической реакции в легких по типу гиперчувствительности Th2-типа, проявления которой имеют очень высокое сходство с ERD. Подобные реакции наблюдали у младенцев, вакцинированных вакциной против инактивированного формалином респираторно-синцитиального вируса (RSV) и затем естественно инфицированных RSV, а также в исследованиях на животных, иммунизированных аналогичной вакциной, которым впоследствии был введен вирус RSV²⁴.

В настоящее время информация о механизмах развития инфекции, последствиях инфекционного процесса и потенциальном риске развития ERD ограничена. Кроме того, сложно сделать вывод о значимости экстраполяции информации на человека, полученной в исследовании на животных. Тем не менее исследования на животных моделях (например, на грызунах и приматах) считаются необходимыми для изучения потенциала ERD, связанного с вакцинами. При проведении данных исследований необходимо использовать иммунные маркеры ERD процесса, характеризующие функциональные свойства иммунных ответов, гуморальный (нейтрализующие антитела) ответ и оценку баланса Th1/Th2 у животных, вакцинированных клинически значимыми дозами кандидатной вакцины против COVID-19.

²³ Там же.

²⁴ Там же.

²⁵ Annex 9. Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 924. WHO Technical Report Series, No. 1004, 2017. https://www.who.int/biologicals/expert_committee/WHO_TRS_1004_web_Annex_9.pdf?ua=1

²⁶ Development and licensure of vaccines to prevent COVID-19. Guidance for industry (FDA-2020-D-1137). CBER/FDA; 2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-and-licensure-vaccines-prevent-covid-19>

²⁷ Development and licensure of vaccines to prevent COVID-19. Guidance for industry (FDA-2020-D-1137). CBER/FDA; 2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-and-licensure-vaccines-prevent-covid-19>

Emergency use authorization for vaccines to prevent COVID-19. Guidance for Industry. October 2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/emergency-use-authorization-vaccines-prevent-covid-19>

²⁸ Development and licensure of vaccines to prevent COVID-19. Guidance for industry (FDA-2020-D-1137). CBER/FDA; 2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-and-licensure-vaccines-prevent-covid-19>

E6(R2) Good clinical practice: integrated addendum to ICH E6(R1). Guidance for Industry. <https://www.ich.org/page/efficacy-guidelines>

Клинические исследования вакцин против COVID-19

Основным документом, регламентирующим проведение клинических исследований вакцин против COVID-19, для большинства стран является руководство Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, подготовленное ВОЗ, последняя редакция которого опубликована в 2017 г.²⁵ В руководство FDA по разработке и лицензированию вакцин против COVID-19 включен раздел, посвященный клиническим исследованиям²⁶.

В обычных условиях (без эпидемии) оценка эффективности вакцин проводится с учетом механизма действия вакцины. В настоящее время механизмы иммунного ответа на введение вакцины против COVID-19 еще мало изучены и отсутствуют обоснованные и общепринятые суррогатные конечные точки эффективности вакцины против COVID-19, которые могли бы с достаточной вероятностью предсказать клинический эффект от вакцинации. Поэтому основным подходом для демонстрации эффективности вакцины против COVID-19 является прямое доказательство способности вакцины предотвращать развитие инфекционного процесса.

Согласно стандартному подходу (в условиях без эпидемии), на первых фазах (I и II фаза) клинических исследований вакцины необходимо продемонстрировать переносимость и безопасность вакцины и обосновывать дозу препарата. Для этого обычно бывает достаточно включение в исследование около 100 добровольцев. На поздних этапах клинических исследований (III фаза) проводится оценка (подтверждение) эффективности и безопасности вакцины, и для доказательства безопасности вакцины выборка должна включать не менее 3000 добровольцев. Причем для оценки эффективности и безопасности вакцин очень важны исследования эффективности и безопасности в специальных группах пациентов (пожилые, дети, лица с хроническими заболеваниями, иммунокомпрометированные лица, беременные и др.).

В условиях пандемии допускается обоснованное сокращение некоторых этапов клинического исследования эффективности и безопасности для регистрации вакцины. Если будет научно определен такой уровень иммунного ответа на введение вакцины, на основании которого можно будет с достоверной вероятностью предсказать протективность в отношении COVID-19, то возможно проведение клинических исследований на малой выборке добровольцев (без исследований в особых группах пациентов) с использованием данного суррогатного маркера эффективности (иммуногенности вакцины) для регистрации вакцины. Представляется обоснованным, что такая вакцина может быть зарегистрирована только на особых условиях и на определенное время. Разработчик должен в пострегистрационном периоде провести исследования, которые позволят в полном объеме достоверно охарактеризовать эффективность и безопасность вакцины²⁷.

Несмотря на наличие пандемии, клинические исследования должны проводиться с соблюдением правил надлежащей клинической практики (GCP)²⁸. Частично указания по прове-

дению клинических исследований в условиях пандемии отражены в специальных рекомендациях, например в руководстве Guidance on conduct of clinical trials of medical products during COVID-19 public health emergency, Guidance for industry, investigators, and institutional review boards²⁹ или руководстве Guidance on the management of clinical trials during the COVID-19 (coronavirus) pandemic³⁰, подготовленных FDA и EMA.

Сократить сроки клинических исследований, необходимых для регистрации, позволяет адаптивный (гибкий) дизайн, который представляет собой такой дизайн клинического исследования, в котором заранее запланирована возможность изменения одного (или более) аспектов исследования на основании промежуточного анализа данных. Подобное изменение дизайна должно быть заранее описано в протоколе исследования. Использование адаптивного дизайна, помимо сокращения длительности клинического исследования, позволяет уменьшить объем выборки. Однако при этом возрастает вероятность получения ложных результатов. Основными рисками при использовании адаптивного дизайна могут быть: ложные выводы промежуточного анализа (так как ограничено количество данных), субъективные и (или) системные ошибки, повышение вероятности ошибки при дальнейшем исследовании, повышение вероятности ошибки I рода, снижение мощности исследования и, в случае коррекции ошибки, увеличение размера выборки. Адаптивный дизайн представляет собой очень тонкий механизм с высокой вероятностью развития ошибки, и его применение может быть ограниченным в случае клинических исследований некоторых групп препаратов, например вакцин.

Авторы отдельных научных работ рассматривают адаптивный дизайн как инновационный подход в области клинических исследований³¹. В то же время мнение регуляторных органов по вопросам достоверности при применении адаптивного дизайна окончательно не сформировано, отсутствуют утвержденные нормативные документы, подробно регламентирующие проведение подобных исследований. По данному вопросу опубликовано только два документа:

- в 2007 г. EMA опубликовало свое представление об адаптивном дизайне (Reflection paper on methodological issues in confirmatory clinical trials planned with an adaptive design), которое не является нормативным документом³²;

- в 2010 г. FDA был подготовлен проект (draft) руководства Adaptive design clinical trials for drugs and biologics. Guidance for Industry, которое было утверждено в 2019³³. В указанном документе рекомендуется крайне осторожно подходить к использованию данного вида дизайна. Так, указано, что он мало подходит для клинических исследований вакцинных препаратов, поскольку для оценки эффективности и безопасности вакцин требуется исследование в большой популяции. Использование

данного дизайна для клинических исследований возможно на поздних фазах клинических исследований (например, оценка эффективности и безопасности в разных группах (когортах)).

На первых фазах клинических исследований вакцины против COVID-19 (оценка переносимости, безопасности, обоснование дозы) в исследование могут быть включены только здоровые добровольцы не старше 55 лет с низким риском развития тяжелой клинической формы COVID-19. При планировании исследований ранних фаз клинических исследований для обоснования критериев невключения в исследование рекомендуется использовать официальные интернет-сайты, на которых содержатся результаты мониторинга эпидемии, содержащие клинические аспекты заболевания. Данная информация позволит обосновать критерии для групп риска развития COVID-19. Например, на сайте Центров по контролю и профилактике заболеваний США указаны следующие заболевания и состояния, которые являются риском развития тяжелых форм инфекции: бронхиальная астма (от средней до тяжелой степени), цереброваскулярные заболевания, кистозный фиброз, гипертония или высокое кровяное давление, состояния с ослабленным иммунитетом (пересадка костного мозга, иммунодефициты, СПИД, использование кортикостероидов или других лекарственных средств, провоцирующих развитие иммунодефицитных состояний), неврологические состояния (такие, как деменция), заболевания печени, беременность, фиброз легких (с повреждением или рубцеванием тканей легких), курение, талассемия и сахарный диабет первого типа³⁴. Также на первых этапах в исследование не могут быть включены лица с высоким риском заражения COVID-19 (например, медицинские работники).

В клинические исследования на ранних фазах могут быть включены лица старше 55 лет без заболеваний и состояний, относящихся к факторам риска при COVID-19. Но они вводятся в исследование не ранее чем через 7 дней после однократной иммунизации здоровых лиц в возрасте до 55 лет.

FDA рекомендует включать в исследование лиц, у которых зарегистрировано бессимптомное (до исследования) течение COVID-19. При массовой вакцинации выявление лиц, которые бессимптомно перенесли COVID-19, было бы экономически нецелесообразно, а также замедлило бы темпы иммунизации, поэтому в руководстве FDA также рекомендуется включение в исследование лиц, у которых до исследования клинически или лабораторно установлено бессимптомное течение инфекции. При этом лица с COVID-19 в острой форме или другими острыми инфекционными заболеваниями не могут быть включены в исследование³⁵.

Одной из основных конечных точек изучения эффективности вакцины против COVID-19 является лабораторное подтверждение наличия SARS-CoV-2 инфекции, в том числе и бессимптомных форм COVID-19. Для выявления острых форм может быть использован метод ПЦР. Показателем на-

²⁹ Guidance on conduct of clinical trials of medical products during COVID-19 public health emergency. Guidance for industry, investigators, and institutional review boards (FDA-2020-D-1106). CBER/FDA, CDRH/FDA, CDER/FDA; 2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/fda-guidance-conduct-clinical-trials-medical-products-during-covid-19-public-health-emergency>

³⁰ Guidance on the management of clinical trials during the COVID-19 (coronavirus) pandemic. Version 3, 28/04/2020. EMA; 2020. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-10/guidanceclinicaltrials_covid19_en.pdf

³¹ Востокова НВ. Возможности применения адаптивного дизайна в клинических исследованиях оригинальных препаратов одного фармакологического класса: дис. ... канд. фарм. наук: М.; 2017.

³² Reflection paper on methodological issues in confirmatory clinical trials planned with an adaptive design (CHMP/EWP/2459/02). CHMP/EMA; 2007.

³³ Adaptive design clinical trials for drugs and biologics. Guidance for Industry (FDA-2018-D-3124). CBER/FDA, CDER/FDA; 2019. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/adaptive-design-clinical-trials-drugs-and-biologics-guidance-industry>

³⁴ People with Certain Medical Conditions. Updated Nov. 2, 2020. Centers for Disease Control and Prevention. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fneed-extra-precautions%2Fgroups-at-higher-risk.html

³⁵ Development and licensure of vaccines to prevent COVID-19. Guidance for industry (FDA-2020-D-1137). CBER/FDA; 2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-and-licensure-vaccines-prevent-covid-19>

личия инфекции является выявление антител к антигенам SARS-CoV-2, которые не входят в состав вакцины, для этого могут быть использованы иммунологические, серологические и вирусологические методы.

Для оценки эффективности вакцины оптимальными конечными точками эффективности являются частоты развития клинических проявлений (симптомов) инфекции, которые могут быть использованы (в зависимости от стадии клинических исследований) в качестве первичных или вторичных конечных точек эффективности. Основными клиническими проявлениями инфекции являются: лихорадка или озноб, кашель, одышка или затрудненное дыхание, усталость, мышечные боли, головная боль, потеря вкуса или обоняния, боль в горле, заложенность или насморк, тошнота или рвота и диарея.

В качестве одной из вторичных конечных точек эффективности вакцины против COVID-19 должна быть выбрана частота развития тяжелой клинической формы заболевания. При этом возможно, что разрабатываемая вакцина против COVID-19 будет намного более эффективной в предотвращении именно тяжелых форм относительно заболевания в легкой форме. Поэтому программа исследования должна включать регистрацию тяжелых форм инфекции. Для характеристики тяжелых форм должны использоваться вирусологические методы подтверждения инфекции и основные клинические проявления при тяжелой форме. Развитие тяжелых форм инфекции сопровождается развитием следующих симптомов: нарушение (повреждение) дыхательной системы (частота дыхания более 30 в 1 мин, частота сердечных сокращений более 125 в 1 мин, снижение уровня насыщения кислородом крови $SpO_2 \leq 93\%$) вплоть до развития дыхательной недостаточности (определяется как потребность в высокопоточной оксигенации, неинвазивной вентиляции, искусственной вентиляции легких или экстракорпоральной мембранной оксигенации (ЭКМО)), симптомы шока (САД менее 90 мм рт. ст., ДАД менее 60 мм рт. ст. или потребность в вазопрессорах), симптомы значительного нарушения деятельности почек, печени или нервной системы, вплоть до летального исхода³⁶.

При проведении клинических исследований в обычных условиях (при достаточном количестве выборки и при исследовании в особых группах) для оценки эффективности вакцин используются прямые показатели эффективности (например, процент добровольцев, у которых не было зарегистрировано развитие инфекции). При проведении клинических исследований в период пандемии (малая выборка и короткий период наблюдения) особое значение приобретают суррогатные маркеры эффективности, такие как иммуногенность вакцины. В идеале суррогатный маркер эффективности определяется в процессе исследований с участием человека, когда конечными точками эффективности являются клинические показатели. В условиях пандемии и учитывая, что SARS-CoV-2 является новым патогеном, суррогатный маркер может быть получен не только в процессе исследований на человеке, но и из других источников. В данной ситуации необходимо обосновать выбор суррогатного маркера конечной точки эффективности вакцины против COVID-19³⁷.

Клинические исследования вакцин против COVID-19 на модели контролируемой инфекции у здоровых добровольцев

Одним из путей ускорения этапа клинических исследований вакцины является исследование с участием здоровых добровольцев при моделировании у них контролируемой ин-

фекции. Изучение эффективности и безопасности вакцины на здоровых добровольцах, которых в строго контролируемых условиях инфицируют соответствующим агентом, позволяет получить ответы на многие вопросы, которые не были получены в процессе доклинических исследований на животных. В то же время различные регуляторные организации к заражению здорового человека (хотя и контролируемому) относятся по-разному. Это обусловлено в первую очередь негативным историческим опытом неэтичных исследований как вакцин, так и других препаратов на человеке.

Начало исследований вакцин с участием человека можно отнести к 1796 г., когда в Великобритании были сделаны первые прививки против оспы. Среди негуманных исследований вакцин на человеке следует отметить исследования, которые проводили с 1930-х гг. в США. В клиниках пациентов заражали гонореей для изучения разрабатываемых вакцин. До 1970-х гг. в США проводились исследования, в ходе которых заключенных и детей-сирот заражали вирусами полиомиелита и кори для оценки эффективности вакцин. Следует отметить, что в то время еще не было обоснованных нормативных требований для проведения подобных исследований, которые имеются в настоящее время³⁸. Первые 10 этических принципов проведения исследований с использованием заражения человека были сформированы после того, как на Нюрнбергском процессе были озвучены условия, в которых нацистами проводились опыты на заключенных концлагерей, которых заражали тифом с целью изучения эффективности вакцин.

С того времени принципы (в первую очередь этические), допускающие контролируемое заражение здоровых лиц с целью изучения эффективности и безопасности вакцин, были кардинально пересмотрены. В настоящее время при проведении исследований с участием человека здоровые добровольцы могут быть заражены возбудителем, близким к дикому типу, или ослабленным патогеном (вплоть до полного блокирования патогенности), или генетически модифицированным возбудителем. Исследования должны проводиться при полной информированности добровольца, при участии специально обученного персонала в специальных медицинских учреждениях.

В последнее время активно проводятся такие исследования некоторых вакцин с участием здоровых добровольцев. Необходимость проведения данных исследований может быть обоснована многими факторами, например изучением вакцин для туристов или лиц, которые направляются в эндемические очаги инфекции, отсутствием информации о механизмах развития как самой инфекции, так и иммунного ответа на вакцину, отсутствием релевантной модели на животных и др. Например, невозможно на животных создать модель инфекционного процесса, вызванного возбудителями тифа и паратифа. В последние годы при соблюдении нормативно-этических принципов для изучения эффективности и безопасности вакцин были проведены исследования при инфицировании здоровых добровольцев возбудителями малярии, кишечных бактериальных инфекций, брюшного тифа, гриппа, а также респираторно-синцитиальным вирусом, вирусом денге, норовирусом и др. [2–11].

Безопасность (минимальный риск) проведения исследований при заражении человека вирусом SARS-CoV-2 часто обосновывается включением в исследование только молодых и здоровых добровольцев. Так как в данной популяции (18–30 лет) частота госпитализаций инфицированных SARS-CoV-2

³⁶ Там же.

³⁷ Там же.

³⁸ Human challenge trials for vaccine development: regulatory considerations. WHO Technical Report Series, No. 1004, 2017.

составляет 1%, а частота смертельных исходов — около 0,03% [12]. При этом исследования должны проводиться в специализированных учреждениях с особенно тщательным мониторингом и быстрым доступом к раннему поддерживающему лечению, включая всю необходимую, в том числе высокотехнологическую медицинскую помощь³⁹.

В то же время ряд авторов указывает, что именно исследование с заражением человека SARS-CoV-2 имеет высокие риски и неопределенности относительно исследований при заражении другими инфекционными агентами, так как патогенез COVID-19 в настоящее время изучен слабо, отсутствует специфическое лечение, что в конечном итоге может привести к развитию тяжелой формы заболевания и даже смерти добровольцев [13–16].

В настоящее время основным документом, регламентирующим проведение исследований с участием человека, являются рекомендации Human challenge trials for vaccine development: regulatory considerations, подготовленные ВОЗ, последняя версия опубликована в 2017 г.⁴⁰ Учитывая потенциальные преимущества данного подхода для ускорения разработки вакцин против COVID-19, ВОЗ подготовила рекомендации Key criteria for the ethical acceptability of COVID-19 human challenge studies⁴¹. Предполагается, что при разработке вакцины против COVID-19 заражение вирусом SARS-CoV-2 здоровых добровольцев может позволить описать развитие инфекционного процесса и иммунитета с момента инфицирования, оценить значимость тестов для оценки иммунитета к SARS-CoV-2, охарактеризовать взаимосвязь (корреляции) между факторами иммунной защиты и рисками передачи инфекции и др. [17, 18]. В условиях пандемии и в отсутствие адекватной животной модели инфекции COVID-19 проведение исследований с участием человека может решить многие вопросы, стоящие перед разработчиками вакцины, и сократить время, которое необходимо для регистрации и выведения препарата на фармацевтический рынок.

В рекомендациях ВОЗ⁴² подробно прописаны условия проведения провокационных исследований путем инфицирования человека COVID-19 и охарактеризованы 8 критериев (научная обоснованность; оценка соотношения «польза–риск»; общественные консультации и взаимодействие с экспертным сообществом и регуляторными органами; взаимное координирование; подбор высококвалифицированных клинических центров; строгие критерии отбора участников клинического исследования; экспертный надзор; информированное согласие), позволяющих свести к минимуму риск при проведении данных исследований.

В научных публикациях можно встретить различные точки зрения на проведение провокационных исследований путем заражения здорового человека инфекционным агентом. Специалисты ВОЗ считают, что данный вид исследования может

ускорить разработку вакцин и разрешить вопросы, возникающие при изучении и регистрации препаратов. В ЕМА отсутствуют и нормативные документы, и информация, отражающая позицию регуляторного органа по данному вопросу. В то же время в Бельгии и Великобритании активно проводятся провокационные исследования с участием человека. В Великобритании в январе 2021 г. планируется начало проведения таких исследований с инфицированием 30–50 здоровых добровольцев 18–30 лет вирусом SARS-CoV-2⁴³. С целью разработки вакцинных препаратов в США в провокационных исследованиях с участием человека используются различные виды инфекционных агентов. При этом специалисты FDA крайне осторожно высказываются по поводу использования данных исследований для разработки вакцин против COVID-19, указывая на этические проблемы ввиду отсутствия эффективного лечения COVID-19⁴⁴. В официальных руководствах FDA по разработке и регистрации вакцин против COVID-19 подобный тип исследования не рассматривается⁴⁵.

Первые результаты разработки вакцин против COVID-19

В настоящее время в России выдано три регистрационных удостоверения (РУ) на вакцины для профилактики COVID-19⁴⁶:

- Гам-КОВИД-Вак Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2 (РУ № ЛП-006395 от 11.08.2020, производитель ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»);

- Гам-КОВИД-Вак-Лео Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2 (РУ № ЛП-006423 от 25.08.2020, производитель ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»);

- ЭпиВакКорона Вакцина на основе пептидных антигенов для профилактики COVID-19 (РУ № ЛП-006504 от 13.10.2020, производитель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Первые два препарата являются двумя лекарственными формами (раствор для внутримышечного введения и лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения) одной вакцины, также известной под коммерческим названием «Спутник-V» [19]. Все регистрационные удостоверения выданы на условиях, в частности срок их действия ограничен до 01.01.2021, а для получения постоянной регистрации требуется проведение широкомасштабных клинических исследований с целью подтверждения их профилактической эффективности.

Еще четыре вакцины в мире получили ограниченное разрешение регуляторных органов на применение:

- аденовекторная вакцина компании CanSino Biological Inc. (Китай) 25.06.2020 была одобрена для ограниченного применения у военнослужащих армии Китая⁴⁷;

³⁹ Клиническое ведение тяжелой острой респираторной инфекции при подозрении на коронавирусную инфекцию COVID-19: временные рекомендации. 13 марта 2020 г. ВОЗ; 2020.

⁴⁰ Human challenge trials for vaccine development: regulatory considerations. WHO Technical Report Series, No. 1004, 2017.

⁴¹ Key criteria for the ethical acceptability of COVID-19 human challenge studies. 6 May 2020. WHO Working Group for Guidance on Human Challenge Studies in COVID-19. WHO; 2020.

⁴² Там же.

⁴³ Dozens to be deliberately infected with coronavirus in UK 'human challenge' trials. Nature. 2020;586:651–2. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02821-4>

⁴⁴ FDA official casts doubt on 'challenge trials' for Covid-19 vaccine. <https://www.politico.com/news/2020/07/08/coronavirus-vaccine-fda-353088>

⁴⁵ Development and licensure of vaccines to prevent COVID-19. Guidance for industry (FDA-2020-D-1137). CBER/FDA; 2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-and-licensure-vaccines-prevent-covid-19>

Emergency use authorization for vaccines to prevent COVID-19. Guidance for Industry. October 2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/emergency-use-authorization-vaccines-prevent-covid-19>

⁴⁶ <http://grls.rosminzdrav.ru>

⁴⁷ CanSino's COVID-19 vaccine candidate approved for military use in China. June 29, 2020. Reuters. <https://www.reuters.com/article/us-health-coronavirus-china-vaccine/cansinos-covid-19-vaccine-candidate-approved-for-military-use-in-china-idUSKBN2400DV>

Таблица 2. Уровень специфических антител к рецептор-связывающему домену (receptor-binding domain, RBD) в реакции ИФА на 14 и 28 сут после вакцинации рекомбинантной аденовирусной вакциной производства CanSino, Китай (по F.-C. Zhu с соавт. [20])

Table 2. The level of ELISA antibodies to the receptor-binding domain (RBD) on days 14 and 28 after immunisation with a recombinant adenovirus vaccine by CanSino, China (adapted from F.-C. Zhu et al. [20])

Показатель Parameter	Номер группы Group			Уровень значимости p value
	1 (низкая доза), 95% ДИ (low dose), 95% CI	2 (средняя доза), 95% ДИ (middle dose), 95% CI	3 (высокая доза), 95% ДИ (high dose), 95% CI	
Значение средней геометрической величины титров на 14 сут Geometric mean titre on day 14	76,5 (44,3–132,0)	91,2 (55,9–148,7)	132,6 (80,7–218,0)	0,29
4-кратное и более увеличение титра на 14 сут At least a four-fold increase in the titre on day 14	16 (44%)	18 (50%)	22 (61%)	0,35
Значение средней геометрической величины титров на 28 сут Geometric mean titre on day 28	615±8 (405±4–935±5)	806±0 (528±2–1229±9)	1445±8 (935±5–2234±5)	0,016
4-кратное и более увеличение титра на 28 сут At least a four-fold increase in the titre on day 28	35 (97%)	34 (94%)	36 (100%)	0,77

- инактивированная вакцина компании Sinovac (Китай) в июле 2020 г. получила в Китае ограниченное разрешение на применение в чрезвычайных условиях⁴⁸;

- два варианта инактивированной вакцины разработчика Sinopharm (Китай) 14.09.2020 получили в Объединенных Арабских Эмиратах разрешение на применение в чрезвычайных условиях⁴⁹.

Всего, по данным ВОЗ, в мире в разработке находится около 200 вакцин против COVID-19, из них более 40 вакцин — на стадии клинических исследований⁵⁰. В научных публикациях активно обсуждаются подходы для разработки оптимальной вакцины против COVID-19. Приоритетными считаются вакцины, полученные с применением современных методов биотехнологии, например технологии с использованием наночастиц, РНК- и ДНК-вакцины. Согласно единичным опубликованным результатам клинических исследований, успешными могут оказаться следующие вакцины против COVID-19: РНК-вакцина (Moderna, США), ДНК-вакцина на основе аденовируса типа 5 (CanSino, Китай), ДНК-вакцина (Inovio Pharmaceuticals, США), вакцина ChAdOx1 nCoV-19 на основе нереплицирующегося аденовируса шимпанзе (Оксфордский университет, Великобритания и др.), РНК-вакцина (BioNTech, Германия, США), векторная вакцина на основе аденовируса человека 5 и 26 типов (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи», Россия) и др. [20–23].

В настоящее время известны только единичные публикации, в которых приводятся результаты оценки эффективности и безопасности вакцин против COVID-19. В работе F.-C. Zhu с соавт. [20] представлены результаты изучения I фазы клинического исследования вакцины против COVID-19 на основе нереплицирующегося аденовируса типа 5 (Ad5) (CanSino, Китай).

Исследование было проведено среди здоровых добровольцев (108 человек), которые были рандомизированы в 3 группы по 36 человек. Добровольцам внутримышечно однократно вводили вакцину в трех дозах: первая группа получила дозу 5×10^{10} , вторая группа — 1×10^{11} и третья группа — 15×10^{11} вирусных частиц. Оценку эффективности и безопасности проводили в течение 28 сут после введения вакцины.

В течение первых 7 сут после вакцинации по крайней мере одно нежелательное явление было зарегистрировано у 30 (83%) участников в первой группе, у 30 (83%) участников во второй группе и у 27 (75%) участников в третьей группе. Наиболее частой местной нежелательной реакцией была боль в месте инъекции у 58 (54%) участников, а наиболее частыми общими нежелательными реакциями были повышение температуры (50 (46%)), утомляемость (47 (44%)), головная боль (42 (39%)) и мышечные боли (18 (17%)). Большинство нежелательных реакций, о которых сообщалось во всех группах с различной дозировкой, были легкой или средней степени тяжести. В течение 28 сут после вакцинации не было отмечено серьезных нежелательных явлений. Изучение динамики формирования специфических антител в ответ на введение вакцины показало, что наибольшее повышение титра наблюдалось на 28 сут исследования (табл. 2) [20].

Данные результаты продемонстрировали дозозависимое повышение содержания противовирусных антител (94–100%) относительно исходного уровня. В то же время уровень нейтрализующих антител повысился на 50% в первой и второй группах и на 100% в третьей группе (табл. 3). Специфический Т-клеточный ответ достиг максимума на 14 сут после вакцинации.

⁴⁸ Sinovac's coronavirus vaccine candidate approved for emergency use in China — source. August 28, 2020. Reuters. <https://uk.reuters.com/article/uk-health-coronavirus-china-vaccines/sinovacs-coronavirus-vaccine-candidate-approved-for-emergency-use-in-china-source-idUKKBN2500Z1>

⁴⁹ UAE announces emergency approval for use of COVID-19 vaccine. September 14, 2020. Reuters. <https://www.reuters.com/article/us-health-coronavirus-emirates-vaccine/uae-announces-emergency-approval-for-use-of-covid-19-vaccine-idUSKBN26520M>

⁵⁰ Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. 15 October 2020. WHO. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>

Таблица 3. Уровень вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 на 14 и 28 сут после вакцинации рекомбинантной аденовирусной вакциной производства CanSino, Китай (по F.-C. Zhu с соавт. [20])
Table 3. The level of neutralising antibodies to SARS-CoV-2 virus on days 14 and 28 after immunisation with a recombinant adenovirus vaccine by CanSino, China (adapted from F.-C. Zhu et al. [20])

Показатель Parameter	Номер группы Group			Уровень значимости p value
	1 (низкая доза), 95% ДИ (low dose), 95% CI	2 (средняя доза), 95% ДИ (middle dose), 95% CI	3 (высокая доза), 95% ДИ (high dose), 95% CI	
Уровень нейтрализующих антител на 14 сут Level of neutralising antibodies on day 14	8,2 (5,8–11,5)	9,6 (6,6–14,1)	12,7 (8,5–19,0)	0,24
4-кратное и более увеличение титра на 14 сут At least a four-fold increase in the titre on day 14	10 (28%)	11 (31%)	15 (42%)	0,42
Уровень нейтрализующих антител на 28 сут Level of neutralising antibodies on day 28	14,5 (9,6–21,8)	16,2 (10,4–25,2)	34,0 (22,6–50,1)	0,0082
4-кратное и более увеличение титра на 28 сут At least a four-fold increase in the titre on day 28	18 (50%)	18 (50%)	27 (75%)	0,046

Таким образом, результаты начальных клинических исследований продемонстрировали хорошую переносимость и безопасность вакцины против COVID-19 на основе нереплицирующегося аденовируса типа 5 (Ad5) и ее высокую иммуногенность.

В работе P. M. Folegatti с соавт. [21] представлены предварительные результаты клинических исследований I/II фазы вакцины на основе аденовируса шимпанзе (ChAdOx1 nCoV-19), вызывающей экспрессию спайкового белка SARS-CoV-2 в целевых клетках. В качестве контроля использовали конъюгированную менингококковую вакцину (MenACWY). В исследование были включены 1077 здоровых добровольцев в возрасте 18–55 лет без клинических и лабораторных признаков инфицирования SARS-CoV-2. Добровольцы были рандомизированы в две группы в соотношении 1:1. Препарат ChAdOx1 nCoV-19 вводили однократно внутримышечно в дозе 5×10^{10} вирусных частиц. В отдельной группе добровольцам через 28 сут вводили бустерную дозу. В другой отдельной группе добровольцы получали до введения вакцины парацетамол для снижения развития и выраженности поствакцинальных нежелательных реакций. Основными системными нежелательными реакциями были слабость и головная боль. Слабость была зарегистрирована в группе ChAdOx1 nCoV-19 у 340 (70%) участников исследования, не получавших парацетамол, и у 40 (71%), получавших парацетамол, и в группе MenACWY у 227 (48%) участников исследования, не получавших парацетамол, и у 26 (46%) — получавших парацетамол. В то же время головные боли были зарегистрированы в группе ChAdOx1 nCoV-19 у 331 (68%) участника, не получавшего парацетамол, и у 34 (61%), получавших парацетамол, и в группе MenACWY у 195 (41%) участников, не получавших парацетамол, и у 21 (37%) участника, получавшего парацетамол [21].

Другие системные нежелательные реакции были распространены в группе ChAdOx1 nCoV-19 следующим образом: мышечные боли — у 294 (60%) участников, не получавших парацетамол, и 27 (48%) — получавших парацетамол, недо-

могание (296 (61%) и 27 (48%)), озноб (272 (56%) и 15 (27%)) и лихорадка (250 (51%) и 20 (36%)). В группе ChAdOx1 nCoV-19 87 (18%) участников, не получавших парацетамол, и 9 (16%) участников, получавших парацетамол, сообщили о повышении температуры тела не менее 38 °C, а 8 (2%) пациентов, не получавших парацетамол, сообщили о температуре тела 39 °C и выше [21].

Наиболее высокое значение средней геометрической величины титров антител (ГГТ) к спайковому белку SARS-CoV-2, определяемых в ИФА, в группе ChAdOx1 nCoV-19 наблюдалось на 28 сут исследования (среднее значение 157 EU⁵¹), после чего оставалось на высоком уровне до 56 сут (119 EU) у участников, которые получили только одну дозу, и увеличивалось до медианного значения 639 EU (360–792 EU) на 56 сут у десяти участников, которые получили бустерную дозу.

У 100% участников (35 человек) было зарегистрировано увеличение титра нейтрализующих антител на 28 сут (медианное значение титра составило 218 EU). Следует отметить, что у 8 добровольцев до начала исследования определялись антитела к вирусу.

Вакцинация ChAdOx1 nCoV-19 приводила к заметному увеличению SARS-CoV-2 спайк-специфичного эффекторного Т-клеточного ответа уже на 7 сут с пиком на 14 сут и высокий уровень клеточного ответа сохранялся до 56 сут. Однако после второй дозы ChAdOx1 nCoV-19 не наблюдалось усиления клеточных ответов. Это согласуется с предыдущими данными о вирусных вакцинах, вводимых по гомологичной схеме прайм-буст иммунизации [21].

В работе L. A. Jackson с соавт. [22] представлены результаты I фазы клинического исследования с увеличением дозы, предназначенного для определения безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины мРНК-1273. Вакцина мРНК-1273 (Moderna, США) представляет собой мРНК в капсуле из четырех липидных наночастиц. Вакцинная мРНК кодирует антиген S-2P, состоящий из гликопротеина SARS-

⁵¹ Единицы ELISA.

CoV-2 с трансмембранным якорем и интактным сайтом расщепления S1-S2.

Включенные в исследование добровольцы в возрасте от 18 до 55 лет получали две инъекции с интервалом 28 сут в дозах: 25, 100 или 250 мкг.

После первого введения системные нежелательные явления наблюдались у 5 участников (33%), получивших дозу 25 мкг, 10 (67%), получивших дозу 100 мкг, и 8 (53%), получивших дозу 250 мкг; все они были легкой или средней степени тяжести. После второго введения вакцины наблюдалось увеличение количества и степени тяжести системных нежелательных явлений у участников, получивших дозу 25 мкг (у 7 из 13 участников (54%)) и у всех добровольцев, получивших дозы 100 и 250 мкг.

Введение вакцины вызывало значительное увеличение титра антител к S-2P. На 57 сут исследования СГТ в группе введения вакцины в дозе 25 мкг составила 299751, в группе введения вакцины в дозе 100 мкг — 782719 и в группе введения вакцины в дозе 250 мкг — 1192154, то есть превышала

уровень антител, который определялся у выздоравливающих лиц, — 142140 (табл. 4). Схожая динамика иммунного ответа наблюдалась при изучении титров специфических антител к RBD (табл. 5).

После первого введения вакцины мРНК-1273 нейтрализующие антитела определялись менее чем у половины добровольцев, после второй инъекции нейтрализующие антитела определялись у всех участников исследования. Самый низкий уровень нейтрализующих антител определялся в группе введения дозы 25 мкг — 112,3; более высокие ответы в группах 100 и 250 мкг были схожими по величине — 343,8 и 332,2 на 43 сут исследования (табл. 6).

Введение препаратов в дозах 25 и 100 мкг инициировало ответы Т-лимфоцитов с маркером CD4, которые при стимуляции S-специфическими пептидными пулами сильно смещались в сторону экспрессии цитокинов Th1 (повышение уровня фактора некроза опухоли- α , ИЛ-2 и интерферона- γ) с минимальной экспрессией Th2 цитокинов (ИЛ-4 и ИЛ-13). После

Таблица 4. Динамика СГТ к антигену S-2P после иммунизации вакциной мРНК-1273 (по L. A. Jackson с соавт. [22])

Table 4. Changes in antibody geometric mean titres to S-2P antigen following immunisation with mRNA-1273 vaccine (adapted from L. A. Jackson et al. [22])

Сутки Day	Наименование группы Group			Реконвалесценты Convalescents
	1 группа (25 мкг), 95% ДИ Group 1 (25 µg), 95% CI	2 группа (100 мкг), 95% ДИ Group 2 (100 µg), 95% CI	3 группа (250 мкг), 95% ДИ Group 3 (250 µg), 95% CI	
1	116(72–187)	131(65–266)	178(81–392)	142140 (81543–247768)
15	32261 (18723–55587)	86291 (56403–132016)	163449 (102155–261520)	
29	40227 (29094–55621)	109209 (79050–150874)	213526 (128832–353896)	
36	391018 (267402–571780)	781399 (606247–1007156)	1261975 (973972–1635140)	
43	379764 (281597–512152)	811119 (656336–1002404)	994629 (806189–1227115)	
57	299751 (206071–436020)	782719 (619310–989244)	1192154 (924878–1536669)	

Таблица 5. Динамика СГТ к рецептор-связывающему домену после иммунизации вакциной мРНК-1273 (по L. A. Jackson с соавт. [22])

Table 5. Changes in antibody geometric mean titres to the RBD following immunisation with mRNA-1273 vaccine (adapted from L. A. Jackson et al. [22])

Сутки Day	Наименование группы Group			Реконвалесценты Convalescents
	1 группа (25 мкг), 95% ДИ Group 1 (25 µg), 95% CI	2 группа (100 мкг), 95% ДИ Group 2 (100 µg), 95% CI	3 группа (250 мкг), 95% ДИ Group 3 (250 µg), 95% CI	
1	55 (44–70)	166 (82–337)	576 (349–949)	37857 (19528–73391)
15	6567 (3651–11812)	34073 (21688–53531)	87480 (51868–147544)	
29	18149 (11091–29699)	93231 (59895–145123)	120088 (71013–203077)	
36	208652 (142803–304864)	499539 (400950–622369)	720907 (591860–878090)	
43	233264 (164756–330259)	558905 (462907–674810)	644395 (495808–837510)	
57	183652 (122763–274741)	371271 (266721–516804)	582259 (404019–839134)	

Таблица 6. Динамика уровня титров вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 в реакции нейтрализации псевдовирионов после иммунизации вакциной мРНК-1273 (по L. A. Jackson с соавт. [22])
Table 6. Changes in neutralising antibody titres to SARS-CoV-2 in pseudovirus neutralisation assay following immunisation with mRNA-1273 vaccine (adapted from L. A. Jackson et al. [22])

Сутки Day	Наименование группы Group			Реконвалесценты Convalescents
	1 группа (25 мкг), 95% ДИ Group 1 (25 µg), 95% CI	2 группа (100 мкг), 95% ДИ Group 2 (100 µg), 95% CI	3 группа (250 мкг), 95% ДИ Group 3 (250 µg), 95% CI	
1	10	10	10	109,2 (59,6–199,9)
15	14,5 (9,8–21,4)	23,7 (13,3–42,3)	26,1 (14,1–48,3)	
29	11,7 (9,7–14,1)	18,2 (12,1–27,4)	20,7 (13,3–32,2)	
36	105,8 (69,8–160,4)	256,3 (182,0–361,1)	373,5 (308,6–452,2)	
43	112,3 (71,2–177,1)	343,8 (261,2–452,7)	332,2 (266,3–414,5)	
57	80,7 (51,0–127,6)	231,8 (163,2–329,3)	270,2 (221,0–330,3)	

второй вакцинации отмечался низкий уровень ответа CD8 T-клеток на S-2P у добровольцев, получивших дозу 100 мкг.

Представленные предварительные результаты ранних фаз клинических исследований вакцин против COVID-19 продемонстрировали хорошую переносимость, безопасность и иммуногенность кандидатных вакцин. В то же время данные исследования выявили и ряд проблем, которые требуют дальнейшей работы для повышения эффективности и безопасности вакцин.

Во-первых, до начала исследования вакцины на основе аденовируса практически у половины добровольцев определялись высокие титры антител к Ad5 (аденовирус). У лиц с высоким начальным титром антител к Ad5 было меньше нежелательных реакций и они протекали в более легкой форме, чем у лиц с низким титром антител к Ad5. В то же время выработка антител (иммуногенность) к COVID-19 у лиц с высоким титром антител к Ad5 была ниже, чем у лиц с низким титром. Влияние антител к аденовирусу на уровень иммуногенности предсказуемо, данная закономерность была установлена при разработке вакцины против вируса Эбола на основе аденовируса [23]. Во-вторых, иммунный ответ (по содержанию нейтрализующих антител) в группе лиц старшего возраста (45–60 лет) был слабее, чем в группе лиц младше 45 лет. В-третьих, повторное (бустерное) введение вакцин не приводило к повышению уровня специфического клеточного иммунного ответа. В-четвертых, повторное (бустерное) введение вакцин вызывало увеличение количества и степени тяжести побочных реакций.

Заключение

Анализ нормативной документации международных и национальных регуляторных организаций показал, что рекомендации, утвержденные ВОЗ, FDA, EMA и Российской Федерацией, сходны между собой в отношении возможности сокращения длительности регистрационного процесса вакцин против COVID-19 в условиях пандемии. Сокращение сроков разработки и регистрации вакцин против вируса SARS-CoV-2 возможно в первую очередь за счет времени, отведенного для экспертизы регуляторным органом. Использование производственной платформы, на которой уже зарегистрированы вакцины на основании результатов оценки эффективности и безопасности, выполненных в полном объеме, позволяет снизить объем исследований для вакцины против COVID-19 за счет предоставления некоторых результатов исследований, полученных для вакцин на используемой ранее платформе. Кроме того, некоторые доклинические ис-

следования могут быть проведены параллельно с клиническими исследованиями, а часть клинических исследований эффективности и безопасности может быть выполнена в пострегистрационном периоде. При этом вакцина может быть зарегистрирована «на условиях» согласно нормативным документам, регламентирующим регистрацию препаратов в чрезвычайных ситуациях. В конечном счете, доклинические и клинические исследования должны быть выполнены в полном объеме, который рекомендован для вакцин, разрабатываемых в неэпидемический период.

Представленные материалы по результатам анализа нормативных требований, регламентирующих разработку и регистрацию вакцин против COVID-19 в условиях пандемии, будут полезны разработчикам и производителям при работе с указанными нормативными требованиями и рекомендациями. Кроме того, представленные результаты анализа международных и национальных (EMA, FDA и др.) нормативных подходов для разработки и регистрации вакцин для профилактики коронавирусной инфекции COVID-19 могут быть полезны при разработке отечественных требований для вакцины против COVID-19 в условиях пандемии.

Вклад авторов. **А. А. Солдатов** — разработка дизайна статьи, обработка и анализ материалов для статьи, написание текста статьи; **Ж. И. Авдеева** — критическое обсуждение текста статьи, редактирование статьи; **В. П. Бондарев** — критическое обсуждение текста статьи, редактирование статьи; **В. А. Меркулов** — интерпретация результатов исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **В. Д. Мосягин** — критическое обсуждение текста статьи, редактирование статьи; **В. Б. Иванов** — критическое обсуждение текста статьи, редактирование статьи; **Д. В. Горенков** — анализ и обобщение данных, доработка текста; **Л. М. Хантимирова** — сбор материала для статьи, доработка текста.

Authors' contributions. **Aleksandr A. Soldatov**—elaboration of the paper design, processing and analysis of materials for the paper, writing the paper; **Zhanna I. Avdeeva**—revision and editing of the paper; **Vladimir P. Bondarev**—revision and editing of the paper; **Vadim A. Merkulov**—interpretation of the study results, approval of the final version of the paper for publication; **Vyacheslav D. Mosyagin**—revision and editing of the paper; **Vyacheslav B. Ivanov**—revision and editing of the paper; **Dmitry V. Gorenkov**—analysis and consolidation of data, follow-on revision of the text; **Leysan M. Khantimirova**—sourcing materials for the paper, follow-on revision of the text.

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. В. А. Меркулов, В. П. Бондарев являются заместителями главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», Ж. И. Авдеева, В. Д. Мосягин, В. Б. Иванов являются членами редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Vadim A. Merkulov and Vladimir P. Bondarev are Deputy Editors-in-chief of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. Zhanna I. Avdeeva, Vyacheslav D. Mosyagin, and Vyacheslav B. Ivanov are members of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Горенков ДВ, Хантиминова ЛМ, Шевцов ВА, Рукавишников АВ, Меркулов ВА, Олефир ЮВ. Вспышка нового инфекционного заболевания COVID-19: β-коронавирусы как угроза глобальному здравоохранению. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечения*. 2020;20(1):6–20. [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. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(1):6–20 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-6-20>
2. Hobson D, Curry RL, Beare AS, Ward-Gardner A. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J Hyg (Lond)*. 1972;70(4):767–77. <https://doi.org/10.1017/s0022172400022610>
3. Roestenberg M, de Vlas SJ, Nieman AE, Sauerwein RW, Hermesen CC. Efficacy of preerythrocytic and blood-stage malaria vaccines can be assessed in small sporozoite challenge trials in human volunteers. *J Infect Dis*. 2012;206(3):319–23. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis355>
4. Mayne B. The injection of mosquito sporozoites in malaria therapy. *Public Health Rep*. 1933;48(31):909–16. <https://doi.org/10.2307/4580870>
5. Black S, Nicolay U, Vesikari T, Knuf M, Del Giudice G, Della Cioppa G, et al. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection for inactivated influenza vaccines in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(12):1081–5. <https://doi.org/10.1097/inf.0b013e3182367662>
6. Neter E, Shumway CN. *E. coli* serotype D433: occurrence in intestinal and respiratory tracts, cultural characteristics, pathogenicity, sensitivity to antibiotics. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1950;75(2):504–7. <https://doi.org/10.3181/00379727-75-18246>
7. Tacket CO, Kotloff KL, Losonsky G, Nataro JP, Michalski J, Kaper JB, et al. Volunteer studies investigating the safety and efficacy of live oral El Tor *Vibrio cholerae* O1 vaccine strain CVD 111. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;56(5):533–7. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.56.533>
8. Laurens MB, Duncan CJ, Epstein JE, Hill AV, Komisar JL, Lyke KE, et al. A consultation on the optimization of controlled human malaria infection by mosquito bite for evaluation of candidate malaria vaccines. *Vaccine*. 2012;30(36):5302–4. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.088>
9. Darton TC, Blohmke CJ, Moorthy VS, Altmann DM, Hayden FG, Clutterbuck EA, et al. Design, recruitment, and microbiological considerations in human challenge studies. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(7):840–51. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(15\)00068-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(15)00068-7)
10. DeVincenzo JP, Whitley RJ, Mackman RL, Scaglioni-Weinlich C, Harrison L, Farrell E, et al. Oral GS-5806 activity in a respiratory syncytial virus challenge study. *N Engl J Med*. 2014;371(8):711–22. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1401184>
11. Memoli MJ, Shaw PA, Han A, Czajkowski L, Reed S, Athota R, et al. Evaluation of antihemagglutinin and antineuraminidase antibodies as correlates of protection in an influenza A/H1N1 virus healthy human challenge model. *mBio*. 2016;7(2):e00417–16. <https://doi.org/10.1128/mbio.00417-16>
12. Verity R, Okell LC, Dorigatti I, Winskill P, Whittaker C, Imai N, et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(6):669–77. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30243-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30243-7)
13. Palacios R, Shah SK. When could human challenge trials be deployed to combat emerging infectious diseases? Lessons from the case of a Zika virus human challenge trial. *Trials*. 2019;20(Suppl 2):702. <https://doi.org/10.1186/s13063-019-3843-0>
14. Shah SK, Kimmelman J, Lyerly AD, Lynch HF, McCutchan F, Miller FG, et al. Ethical considerations for Zika virus human challenge trials. National Institute of Allergy and Infectious Diseases; 2017.
15. Nieman AE, de Mast Q, Roestenberg M, Wiersma J, Pop G, Stalenhoef A, et al. Cardiac complication after experimental human malaria infection: a case report. *Malar J*. 2009;8(1):277. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-277>
16. Sherman AC, Mehta A, Dickert NW, Anderson EJ, Roupael N. The future of flu: a review of the human challenge model and systems biology for advancement of influenza vaccinology. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:107. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00107>
17. Jamrozik E, Selgelid MJ. Ethical issues surrounding controlled human infection challenge studies in endemic low- and middle-income countries. *Bioethics*. 2020;34(8):797–808. <https://doi.org/10.1111/bioe.12802>
18. Lipsitch M, Swerdlow DL, Finelli L. Defining the epidemiology of Covid-19 — studies needed. *N Engl J Med*. 2020;382(13):1194–6. <https://doi.org/10.1056/nejmp2002125>
19. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatullin AI, Shchelyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020;396(10255):887–97. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)31866-3)
20. Zhu FC, Li YH, Guan XH, Hou LH, Wang WJ, Li JX, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet*. 2020;395(10240):1845–54. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)31208-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)31208-3)
21. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Bellij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020;396(10249):467–78. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)31604-4)
22. Jackson LA, Anderson EJ, Roupael NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, et al. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 — preliminary report. *N Engl J Med*. 2020;NEJMoa2022483. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2022483> [Epub ahead of print]
23. Zhu FC, Hou LH, Li JX, Wu SP, Liu P, Zhang GR, et al. Safety and immunogenicity of a novel recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in healthy adults in China: preliminary report of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet*. 2015;385(9984):2272–9. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)60553-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)60553-0)

Об авторах / Authors

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

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

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>

Мосягин Вячеслав Дмитриевич, д-р мед. наук, проф. *Vyacheslav D. Mosyagin*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0269-8337>

Иванов Вячеслав Борисович, д-р мед. наук, проф. *Vyacheslav B. Ivanov*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3637-7179>

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

Хантимирова Лейсан Маратовна, канд. биол. наук. *Leysan M. Khantimirova*. Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6269-0201>

Поступила 31.08.2020

После доработки 20.11.2020

Принята к публикации 04.12.2020

Received 31 August 2020

Revised 20 November 2020

Accepted 4 December 2020

Общая характеристика адъювантов и механизм их действия (часть 1)

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

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

Актуальной проблемой современного здравоохранения является разработка новых вакцин и совершенствование уже используемых в медицинской практике, что обусловлено снижением иммунологической активности населения, появлением новых инфекций или активацией «старых», которые ранее считались побежденными. Неотъемлемой и важной частью современных вакцин являются адъюванты, которые стимулируют развитие иммунного ответа на антиген вакцины. Однако, несмотря на многочисленные усилия по их разработке, в настоящее время в медицинской практике применяется лишь небольшое количество адъювантов. Цель работы — систематизация данных литературы по анализу механизмов действия адъювантов, особенностей их структуры, состава и стимулирующих эффектов, которые опосредуют их иммуноадъювантные свойства. Обобщены сведения об адъювантах, входящих в состав зарегистрированных вакцин, приведена их характеристика, проанализированы молекулярные механизмы действия адъювантов с целью установления взаимосвязи их структуры и проявляемой активности, что является важным для разработки более эффективных и безопасных адъювантов. Представлены сведения о перспективных разработках по совершенствованию уже используемых адъювантов с целью усиления их стимулирующего действия. Сделан вывод о том, что ключевым направлением исследований в области повышения эффективности вакцинации является изучение механизмов, способствующих развитию эффективной защиты от возбудителей инфекции, а также способов стимулирования защитных реакций организма с помощью адъювантов, в первую очередь путем воздействия на систему врожденного иммунитета.

Ключевые слова: вакцина; адъювант; иммуногенность вакцин; инфекция; вирус; антиген; антитела; Т-клетки; В-клетки; иммунитет

Для цитирования: Алпатова НА, Авдеева ЖИ, Лысикова СЛ, Головинская ОВ, Гайдерова ЛА. Общая характеристика адъювантов и механизм их действия (часть 1). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(4):245–256. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-245-256>

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

General Characteristics of Adjuvants and Their Mechanism of Action (Part 1)

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

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

One of priority issues of the present-day healthcare system is development of new vaccines and improvement of existing ones due to decreasing immunocompetence of the population, emergence of new infections and re-emergence of old ones which were previously thought to be under control. Adjuvants have proven to be integral and important components of modern vaccines, as they enhance immune response to the vaccine antigen. However, despite a lot of effort put into their development, only a small number of adjuvants are currently used in clinical practice. The aim of the study was to systematise literature data on the adjuvants' mechanisms of action, their specific structure, composition, and stimulation effects that mediate their immunoadjuvant properties. The paper summarises data on adjuvants used as components in licensed vaccines, describes their characteristics, analyses molecular mechanisms of their action in order to establish correlation between their structure and activity, which is important for the development of more efficacious and safe adjuvants. The paper cites advanced developments aimed at enhancing stimulation effects of existing adjuvants. It concludes by stating that the key research area aimed at improving vaccination efficacy is the study of mechanisms that contribute to the development of effective protection against infectious agents, as well as analysis of how to use adjuvants to stimulate the body's defensive mechanisms, primarily by impacting the innate immunity.

Key words: vaccine; adjuvant; vaccine immunogenicity; infection; virus; antigen; antibody; T cells; B cells; immunity

For citation: Alpatova NA, Avdeeva ZhI, Lysikova SL, Golovinskaya OV, Gayderova LA. General characteristics of adjuvants and their mechanism of action (part 1). *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):245–256. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-245-256>

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

Инфекционные заболевания стоят на втором месте после сердечно-сосудистых заболеваний в списке ведущих причин смертности населения в мире [1]. По данным ВОЗ на 2018 г., распространение вируса гриппа ежегодно приводит к 3–5 млн случаев тяжелых заболеваний и 290–650 тыс. смертей¹. Сообщается, что вирусом гепатита В инфицированы 257 млн человек, что привело к 887 тыс. смертей в 2015 г.² Для профилактики указанных заболеваний применяется вакцинация, конечной целью которой является формирование длительного напряженного специфического иммунитета против возбудителей инфекции [2].

Несмотря на значительные успехи практической медицины в области вакцинации, разработка эффективных и безопасных вакцин остается актуальной проблемой. Появившиеся в последнее время и вновь возвращающиеся заболевания, такие как тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС) в 2003 г., пандемия гриппа H1N1 в 2009 г., геморрагическая лихорадка Эбола в 2014 г., пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 в 2019–2020 гг., свидетельствуют о необходимости применения новых подходов к разработке вакцин [3–5].

Важной задачей также является создание более эффективных вакцин для лиц старшего возраста. С увеличением продолжительности жизни в результате хронических заболеваний у данной категории лиц накапливаются дефекты в работе иммунной системы, что сопровождается нарушением адекватного реагирования организма на введение вакцин. Об этом свидетельствуют результаты, полученные при вакцинации против вирусов гриппа или пневмонии лиц старше 65 лет [6].

Многие из наиболее эффективных и безопасных вакцин разработаны на основе живых, ослабленных возбудителей инфекции. При их применении в организме развивается инфекционный процесс с легким бессимптомным течением, в результате которого формируется длительный иммунитет, аналогичный тому, который наблюдается у лиц, перенесших инфекционное заболевание. Примерами живых аттенуированных вакцин являются вакцины против кори, паротита, краснухи, ветряной оспы, желтой лихорадки.

В ряде случаев вакцины, созданные на основе инактивированных возбудителей, очищенных и рекомбинантных антигенов (АГ), обладают недостаточной иммуногенностью, что требует введения адъювантов с целью стимуляции иммунного ответа, более интенсивного формирования специфических антител (АТ) и активации эффекторных функций Т-клеток [2, 7]. Адъюванты, увеличивая иммуногенность вакцин, повышают их эффективность, что обеспечивает более высокий уровень коллективного иммунитета в общей популяции вакцинированных лиц, а также способствуют повышению показателей сероконверсии в популяциях с меньшей восприимчивостью к вакцинации (например, в группах младенцев, пожилых людей и лиц с наличием иммунной недостаточности). Кроме того, введение адъюванта в состав вакцины позволяет снизить иммунизирующую дозу АГ, что повышает безопасность вакцины с сохранением ее иммуногенных свойств. Это крайне важно в условиях пандемии, когда требуется срочная крупномасштабная вакцинация, а расширение производства вакцины с целью выпуска большего объема продукции не представляется возможным (например, в случае возникновения пандемического вируса гриппа) [7–9].

Тенденции в разработке новых вакцин связаны с использованием генно-инженерных технологий, повышением эффективности и безопасности препаратов, в том числе и при

вакцинации лиц отдельных категорий (группы людей с хроническими заболеваниями, беременные женщины, лица старшего возраста и т.д.). При этом одним из наиболее важных вопросов является выбор подходящего адъюванта для усиления иммуногенности вакцин.

В настоящее время адъюванты разрабатываются и включаются в состав вакцин не только для повышения титра специфических АТ, но и для стимуляции развития адаптивного иммунного ответа на АГ вакцины, увеличения его продолжительности, изменения поляризации иммунного ответа, сокращения времени формирования иммунитета [10, 11]. Адъюванты, применяемые в клинической практике, различаются по своей физико-химической природе и в первую очередь характеризуются своими иммуностимулирующими свойствами. В связи с отсутствием обобщенных данных о механизмах действия адъювантов цель настоящего обзора является актуальной.

Цель работы — систематизация данных литературы по анализу механизмов действия адъювантов, особенностей их структуры, состава и стимулирующих эффектов, которые опосредуют их иммуноадъювантные свойства.

Механизмы действия адъювантов, входящих в состав зарегистрированных вакцин

Вакцины, как и естественные инфекции, действуют, активируя систему врожденного иммунитета, что, в свою очередь, способствует запуску и развитию антиген-специфического адаптивного иммунного ответа. Адъюванты способствуют формированию более выраженного адаптивного иммунного ответа на АГ вакцины путем активации разных звеньев системы врожденного иммунитета и (или) стимуляции процессов транспорта, процессинга и презентации АГ. Функционально адъюванты действуют прямо или косвенно на антиген-презентирующие клетки (АПК), включая дендритные клетки (ДК), и воспринимаются как молекулярные паттерны, связанные либо с инвазией инфекционного агента (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs)), либо с повреждением эндогенных клеточек (молекулярные паттерны, ассоциированные с опасностью (DAMPs)), тем самым активируя сенсорные пути и инициируя развитие иммунного ответа. Адъюванты PAMP-типа являются лигандами для Toll-подобных рецепторов (TLRs) и могут напрямую влиять на ДК, изменяя скорость формирования, выраженность, продолжительность, поляризацию адаптивного иммунного ответа. К адъювантам DAMP-типа относятся минеральные соли, масляные эмульсии, наночастицы и полиэлектролиты. Данные соединения оказывают стимулирующие эффекты на инфильтрацию иммунокомпетентных клеточек, презентацию АГ и созревание эффекторных клеточек [12, 13].

Первыми адъювантами, включенными в состав вакцин, были соединения алюминия. В течение многих лет они являлись практически единственными общепризнанными адъювантами, и только начиная с 1980-х гг. стали применяться новые виды адъювантов с разным механизмом действия. Проведены многочисленные исследования с использованием различных типов адъювантов с целью характеристики их стимулирующей активности и безопасности [1, 7, 12, 13].

В настоящее время регуляторными органами разных стран для использования в вакцинах для человека одобрены такие адъюванты, как соединения алюминия (гидроксид алюминия, фосфат алюминия и др.), масляные эмульсии (MF59, AS03),

¹ Influenza (Seasonal). WHO. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))

² Hepatitis B. WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>

адъювантные системы (AS04, AS01), синтетический олигонуклеотид, содержащий последовательности цитозинагуанина (CpG 1018), виросомы, полиоксидоний, совидон.

Возбудители различных инфекций имеют разные характеристики, которые играют важную роль в процессе формирования иммунного ответа у инфицированных лиц. При выборе адъювантов необходимо учитывать их особенности и механизм действия с целью стимуляции развития оптимального иммунного ответа с учетом уникальных свойств конкретных возбудителей [14].

Среди механизмов действия адъювантов выделяют следующие:

- образование депо в месте инъекции, что способствует увеличению времени контакта с АГ;
- действие адъюванта в качестве системы доставки АГ, что стимулирует процессы поглощения АГ АПК;
- активация системы врожденного иммунитета за счет передачи сигналов через мембранные и внутриклеточные паттерн-распознающие рецепторы (PRRs), что приводит к активации транскрипционных факторов и адаптерных белков, опосредуя выработку провоспалительных цитокинов, хемокинов и интерферонов (IFN) типа I;
- индукция секреции цитокинов и хемокинов, участвующих в активации и миграции иммунокомпетентных клеток;
- активация инфламматомы NLRP3 (способствует формированию воспалительной реакции и индукции выработки провоспалительных цитокинов);
- стимуляция активации и созревания АПК (повышение экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) и костимулирующих молекул, что способствует эффективной активации наивных Т-клеток), стимуляция процесса презентации АГ;
- индукция развития клеточного (Th1) и (или) гуморального (Th2) иммунного ответа;
- участие в реакции герминативных центров, стимуляция продукции высокоаффинных специфических IgG, стимуляция формирования В-клеток памяти при развитии гуморального иммунного ответа [10];
- стимуляция формирования центральных Т-клеток памяти и Т-эффекторных клеток памяти [14].

Характеристика адъювантов и их иммуностимулирующие свойства

Соединения алюминия

Наиболее распространенными адъювантами являются соединения алюминия, которые используются в вакцинах уже более 90 лет и входят в состав 146 зарегистрированных вакцин против многих инфекций по всему миру [15]. Соединения алюминия в зависимости от типа (гидроксид алюминия, фосфат алюминия, алюминицево-калиевые квасцы) характеризуются разными физико-химическими свойствами, которые играют важную роль в их иммуномодулирующем действии [1, 16].

Адъюванты на основе алюминия состоят из наноразмерных частиц, при этом частицы гидроксида алюминия имеют удлиненную форму и размер примерно $4 \times 2 \times 10$ нм, а частицы фосфата алюминия имеют форму пластинки с диаметром около 50 нм. Частицы образуют слабосвязанные пористые агрегаты, размер которых варьирует от 1 до 20 мкм в зависимости от адъюванта. На частицах гидроксида алюминия и (или) фосфата алюминия АГ адсорбируются за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий. В зависимости от типа солей алюминия их поверхностные заряды различаются. Гидроксид

алюминия несет положительный заряд при физиологическом значении pH 7,4 и связывает кислые белки. Фосфат алюминия заряжен отрицательно и, соответственно, связывает основные белки [16].

Наиболее часто используемым химическим веществом в качестве адъюванта является гидроксид алюминия. Однако, несмотря на его широкое распространение и многочисленные исследования по изучению механизмов его адъювантного действия, в полной мере данный вопрос не изучен.

На выраженность иммунного ответа, индуцированного применением гидроксида алюминия в качестве адъюванта, оказывают влияние такие факторы, как скорость адсорбции АГ, сила адсорбции, размер и однородность частиц гидроксида алюминия, доза адъюванта и природа АГ вакцины [17].

Предполагается, что адъювантное действие гидроксида алюминия проявляется за счет комбинации нескольких эффектов, таких как длительное высвобождение АГ (эффект депо); эффективное поглощение АПК частиц алюминия с адсорбированным АГ благодаря их дисперсной природе и оптимальному размеру; активация системы врожденного иммунитета (активация инфламматомы NLRP3, активация комплемента), стимуляция и дифференцировка CD4⁺ Т-клеток. Однако отсутствует единое мнение относительно важности каждого из указанных эффектов [18].

При изучении механизмов, опосредующих адъювантную активность соединений алюминия, одним из первых было предположение о наличии эффекта депо [19, 20]. В данном случае адъюванты усиливают реакцию на АГ, увеличивая время контакта с ними. В течение 2–6 ч после введения вакцины с соединениями алюминия в качестве адъюванта в месте инъекции отмечается образование инфильтрата, в котором преобладают нейтрофилы, макрофаги (МФ), ДК. Адъюванты способствуют взаимодействию АГ с клетками, следствием чего является усиление процессов поглощения и презентации АГ АПК [20, 21]. Предполагается, что увеличение продолжительности презентации АГ опосредовано снижением скорости деградации интернализированного АГ под влиянием адъювантов [22]. Можно заключить, что за счет ассоциации АГ с производными алюминия поддерживается высокая локальная концентрация АГ в течение времени, необходимого для привлечения и миграции АПК, опосредованных повышением секреции цитокинов, а также для индукции воспалительной реакции в месте введения [23, 24].

Однако ведущая роль эффекта депо в адъювантной активности соединений алюминия была поставлена под сомнение. Согласно более поздним данным, депо не является основным механизмом, посредством которого соединения алюминия проявляют свое адъювантное действие [25]. Кроме того, показано, что удаление места введения гидроксида алюминия через 2 ч после иммунизации не оказало влияния на развитие и выраженность адаптивного иммунного ответа лабораторных животных [26]. Вероятно, в течение короткого периода после введения эффект депо важен для иммуностимулирующего действия соединений алюминия, но они проявляют и другие стимулирующие эффекты, которые объясняют их адъювантные свойства [16].

Ранее в нескольких сообщениях отмечалось, что адъюванты в виде частиц активируют инфламматому NLRP3 с помощью нескольких механизмов и это способствует секреции провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины (IL): IL-1 β и IL-18 [27, 28]. В экспериментальных исследованиях H. Li с соавт. [29] установлено, что гидроксид алюминия вызывает активацию инфламматомы, стимулируя синтез IL-1 β

и IL-18 МФ и ДК. У мышей с дефицитом NLRP3, цитозольного адаптерного белка ASC и каспазы-1 наблюдалось снижение уровня гуморального иммунного ответа, индуцированного гидроксидом алюминия. В публикации P. Marrack с соавт. [30] сообщается, что адьюванты на основе алюминия способствуют активации инфламмосомы, вызывая повреждение и разрыв фаголизосом, генерируя активные формы кислорода, высвобождая из поврежденных тканей DAMPs, такие как мочевая кислота и АТФ. Однако авторы подчеркивают, что развитие NLRP3-воспаления и активация каспазы-1 не всегда необходимы для индукции гуморального иммунного ответа при введении соединений алюминия в качестве адьюванта [30]. Обобщая результаты многих исследований, G. Del Giudice с соавт. [31] отмечают, что активация инфламмосомы и роль IL-1 в проявлении адьювантного эффекта соединений алюминия при их введении человеку требует дальнейшего изучения.

Несмотря на то что способность соединений алюминия индуцировать развитие ответа системы врожденного иммунитета через активацию инфламмосомы NLRP3 и выработку провоспалительных цитокинов была отмечена, роль NLRP3 в их адьювантном действии в настоящее время остается спорной [28, 29, 32, 33].

Адьюванты на основе алюминия рассматриваются и как система доставки АГ. Отмечается, что частицы алюминия связываются с липидами мембраны ДК и изменяют их, вызывая активацию клеток, что способствует проникновению АГ через клеточную мембрану. Но при этом интернализации самих частиц ДК не происходит [34]. ДК играют важную роль в проявлении иммуностимулирующего эффекта алюминиевых адьювантов. В работе M. Koal с соавт. [35] отмечается, что при истощении популяции ДК наблюдалось снижение выраженности иммунного ответа. Кроме того, адьюванты на основе алюминия усиливают транспорт АГ с участием мигрирующих ДК от места инъекции в дренирующие лимфатические узлы [36]. Также соединения алюминия индуцируют дифференцировку моноцитов (МЦ) в ДК [16].

В последние годы рядом авторов изучено влияние гидроксида алюминия на стимуляцию первичных МЦ с целью выяснения механизмов, опосредующих активацию указанных клеток. Установлено, что адьювант активирует секрецию INF типа I, потенциально индуцируемую TLR- и (или) NOD-опосредованной передачей сигналов, развитие воспалительной реакции и процесс презентации АГ в комплексе с молекулами МНС классов I и II [37]. Выявлен ряд различий в ответе МЦ, стимулированных гидроксидом алюминия или комбинированной вакциной Инфанрикс® (Infanrix®), содержащей гидроксид алюминия в качестве адьюванта. Повышение продукции цитокина IL-10 отмечено при добавлении вакцины к суспензии МЦ, а при добавлении только гидроксида алюминия этого не наблюдалось. Стимуляция экспрессии генов IFN γ , IL-2 и IL-17A отмечена при добавлении к МЦ гидроксида алюминия, а при добавлении вакцины наблюдалось подавление экспрессии указанных генов. Повышенная экспрессия белков, индуцированных IFN типа I, не наблюдалась при добавлении вакцины в суспензию МЦ, но отмечена при стимуляции клеток гидроксидом алюминия. Полученные результаты свидетельствуют о том, что комбинация АГ и адьюванта оказывает влияние на ответ клеток системы врожденного иммунитета, индуцируемый вакциной [38].

В работе H. HogenEsch [39] отмечается, что одним из механизмов, опосредующим стимулирующий эффект соединений алюминия, является также активация системы комплемента, гуморального фактора врожденного иммунитета.

Результаты изучения роли эндогенных сигналов опасности, таких как ДНК, высвобождающаяся из поврежденных клеток хозяина, в адьювантном действии соединений алюминия представлены в работе T. Marichal с соавт. [40]. Показано, что после введения мышам гидроксида алюминия ДНК клеток хозяина становится доступна для расщепления ферментом (ДНКазой) и оказывает влияние на развитие антиген-специфических ответов Т- и В-клеток [40]. В исследованиях A. S. Mckee с соавт. [41] установлено, что соединения алюминия способствуют высвобождению ДНК хозяина в цитоплазму ДК, при этом в цитозоле ДНК индуцирует пути активации стимулятора генов IFN (STING), что увеличивает презентацию пептидов Т-клеткам в дренирующих лимфатических узлах.

Однако источник ДНК хозяина и механизм ее высвобождения остаются неясными. При изучении ранней реакции на введение адьювантов на основе алюминия установлено, что основными клетками, мигрирующими к месту инъекции в течение 2 ч, являются нейтрофилы. Вокруг места инъекции наблюдалось скопление нейтрофилов, а также наличие в ткани нитей ДНК, так называемых нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET). Предполагается, что соединения алюминия вызывают гибель нейтрофилов и это приводит к высвобождению внеклеточной ДНК, играющей значительную роль в их адьювантном действии [42].

Соединения алюминия способствуют развитию иммунного ответа Th2, стимулируют выработку цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13, которые, повышая продукцию специфических АТ В-клетками, влияют на выраженность гуморального иммунного ответа [30]. Установлено, что соединения алюминия подавляют секрецию IL-12, что может быть причиной дифференцировки Т-клеток в клетки Th2 [43].

Считается, что адьюванты, содержащие алюминий, слабо индуцируют развитие реакций типа Th1, опосредующих формирование клеточного иммунитета для защиты организма от внутриклеточных инфекций [31]. Предполагается, что после введения вакцины указанные адьюванты активируют развитие иммуносупрессивных механизмов, и это ограничивает их способность вызывать развитие ответа Th1. Соединения алюминия усиливают секрецию МФ и ДК цитокина IL-10, обладающего противовоспалительными свойствами. Показано, что отсутствие передачи сигнала IL-10 не нарушает индуцированную гидроксидом алюминия инфильтрацию клеток к месту инъекции, но способствует усилению антиген-специфических ответов Th1. У мышей с дефицитом IL-10 не отмечено значительных изменений в продукции специфических IgG1 АТ после иммунизации с указанным адьювантом. В целом, эти результаты свидетельствуют о том, что введение гидроксида алюминия способствует выработке IL-10, который может блокировать ответы Th1. Возможно, это является одной из причин низкой эффективности гидроксида алюминия в качестве адьюванта для индукции клеточного иммунного ответа [44].

Высказано предположение, что недостаточная степень стимуляции соединениями алюминия системы врожденного иммунитета также может быть причиной развития слабого иммунного ответа Т-клеток [14]. Однако при применении адьювантной системы ASO4, включающей гидроксид алюминия и монофосфорилированный липид А (MPL), который является агонистом TLR4, отмечено формирование выраженного иммунного ответа Th1 [45].

Показано, что адьювантом, способствующим развитию как эффективного иммунного ответа смешанного типа Th1/Th2, так и формированию ответов цитотоксических Т-лимфоцитов, является бис-(3',5')-циклический димерный

аденозинмонофосфат (с-di-AMP). Отмечается, что комбинация с-di-AMP с гидроксидом алюминия способствует стимуляции не только гуморального ответа, но и развитию более выраженного клеточного иммунного ответа [46].

Представляют интерес результаты исследований по оценке нового адъюванта PAA:nanoalum на основе наночастиц алюминия (адъювант Alhydrogel®) и полимера полиакриловой кислоты (PAA), используемого в качестве стабилизирующего агента. Показано, что новый адъювант способствует увеличению иммуногенности противогриппозной вакцины и повышает ее защитный эффект при заражении животных летальной дозой вируса гриппа. Отмечается, что адъювант PAA:nanoalum вызывает развитие выраженного иммунного ответа не только по типу Th2, но и по типу Th1 [47]. В связи с этим он может быть рассмотрен в качестве кандидата для включения в состав вакцин, защищающих от туберкулеза, коклюша и малярии.

Таким образом, адъювантные свойства соединений алюминия опосредованы следующими механизмами: эффект депо, стимуляция фагоцитоза АГ АПК, нарушение целостности мембраны ДК, активация комплемента, стимуляция и дифференцировка CD4⁺ Т-клеток [20, 25].

MF59 (масляная эмульсия)

Первым после соединений алюминия, зарегистрированным в составе вакцин для медицинского применения, стал MF59, адъювант на основе эмульсии сквалена, разработанный компанией GlaxoSmithKline (GSK Vaccines). Эмульсия сквалена относится к типу «масло-в-воде», представлена в виде капель сквалена в непрерывной водной фазе, которые стабилизированы путем добавления двух неионных водорастворимых поверхностно-активных веществ (Tween 80 и Span 85) [48].

Все компоненты MF59 являются безопасными биологически разлагаемыми природными производными. Сквален является углеводородом тритерпенового ряда, он действует как предшественник холестерина, стероидных гормонов и витамина D. Природный сквален получают из печени акулы, полисорбат 80 и сорбитана триолеат 85 являются фармацевтическими веществами растительного происхождения.

Адъювант MF59 лицензирован для использования в вакцинах против пандемического и сезонного гриппа во многих странах. Отмечается, что вакцины против вируса гриппа, содержащие MF59, вызывают формирование более выраженного и продолжительного иммунитета по сравнению с противогриппозными вакцинами без адъюванта, а также более эффективны в профилактике гриппозной инфекции у детей и взрослых в возрасте от 6 до 72 лет [13, 49]. Считается, что этот эффект опосредован способностью MF59 усиливать миграцию и активацию АПК, активацию антиген-специфических CD4⁺ Т-клеток и стимулировать продукцию специфических гемагглютинирующих АТ [13].

Для эффективности адъювантов, относящихся к группе масляных эмульсий, решающим является присутствие липофильной фазы в форме мелких капель (средний размер капель масла составляет около 160 нм). Неэмульгированный сквален не проявляет адъювантного эффекта. Первоначально MF59 был разработан в качестве буфера для доставки АГ, однако при его использовании были обнаружены выраженные адъювантные эффекты, обусловленные его рецептурным составом [50].

В работе E. J. Ko, S. M. Kang [48] отмечается, что действие адъювантов на основе эмульсии сквалена не связано ни с эффектом депо, ни с активацией TLRs, ни с прямой стимуляцией TLR-зависимых сигнальных путей. Показано, что эффект MF59

не зависит от инфламмосомы NALP3, поскольку на интенсивность гуморального иммунного ответа, индуцированного MF59, не влияет отсутствие NALP3 или каспазы-1 у иммунодефицитных мышей. В исследовании A. Seubert с соавт. [51] при иммунизации мышей трехкомпонентной вакциной с адъювантом MF59 против *Neisseria meningitidis* серогруппы B (rMenB) установлено, что для усиления продукции специфических АТ необходима активация адаптерного белка MyD88, то есть передача сигналов происходит по сигнальному пути, независимому от TLRs.

M. Vono с соавт. [52] отмечают, что внутримышечная инъекция всегда сопровождается временным высвобождением АТФ, который действует как эндогенный сигнал опасности. Показано, что в присутствии MF59 высвобождение внеклеточной АТФ из мышц у мышей значительно усиливается. Возможно, АТФ стимулирует развитие иммунного ответа на вакцину, индуцированного адъювантом.

По сравнению с адъювантами на основе соединений алюминия MF59 активирует выработку более широкого спектра цитокинов/хемокинов, которые усиливают привлечение иммунокомпетентных клеток, в том числе и миелоидных CD11b⁺ ДК к месту инъекции [53]. Показано, что MF59 значительно повышает экспрессию CCR2, рецептора для CCL2, который является фактором хемотаксиса МЦ, а также CCL2, CCL3 (факторы хемотаксиса эозинофилов, базофилов и др. клеток) и CXCL8 (IL-8) [54].

Адъювант MF59 косвенно усиливает фагоцитоз и пиноцитоз АГ, при этом вместо прямого воздействия на процессы поглощения АГ ДК он стимулирует привлечение к месту инъекции клеток — предшественников ДК и их дифференцировку в ДК [55]. Показано, что MF59 также способствует дифференцировке МЦ в ДК, которые в дренирующих лимфатических узлах являются основными АПК, нагруженными АГ. Подчеркивается, что это коррелирует с усилением запуска в лимфатических узлах специфического ответа CD4⁺ Т-лимфоцитов, индуцированного АПК [56]. В публикации S. Calabro с соавт. [23] указано, что MF59 активирует и другие АПК, в том числе МЦ и МФ, а также усиливает их миграцию в лимфатические узлы.

Для выяснения роли CD4⁺ Т-клеток в адъювантном действии MF59 исследовали эффективность расщепленной вакцины против Т-зависимого АГ вируса гриппа, содержащей указанный адъювант, при иммунизации мышей с дефицитом CD4 (CD4KO) и мышей дикого типа [57]. Отмечается, что MF59 индуцировал выработку АТ с переключением синтеза изотипов IgG, а также способствовал повышению выживаемости животных, опосредованной ответом CD8⁺ Т-клеток, при их заражении летальной дозой вируса гриппа. MF59 усиливал миграцию различных клеток системы врожденного иммунитета и АПК, таких как CD11b⁺ ДК, к месту инъекции у мышей с дефицитом CD4. Авторы подчеркивают, что для стимулирующего действия MF59 важен уровень экспрессии молекул МНС класса II. Механизмы, опосредующие проявление адъювантных эффектов MF59, независимых от CD4 Т-клеток, еще предстоит определить. Тем не менее авторы подчеркивают, что MF59 способствует преодолению дефекта CD4⁺ Т-клеток в индукции протективного иммунитета при иммунизации Т-зависимой вакциной против вируса гриппа. Кроме того, CD4-независимый путь развития иммунного ответа может быть альтернативным механизмом для некоторых адъювантов [57, 58]. Результаты данного исследования имеют значение для изучения возможности повышения эффективности вакцинации у лиц с ослабленной иммунной реактивностью.

P. R. Pittman [59] отмечает, что по сравнению с соединениями алюминия введение MF59 приводит к образованию АТ

в более высоких титрах и индукции формирования эффекторных Т-клеток, способствуя развитию сбалансированного иммунного ответа смешанного типа Th1/Th2.

При введении человеку MF59 способствует развитию воспалительной реакции в более ранние сроки. Отмечается, что у детей уже в первый день после иммунизации противогриппозной вакциной с MF59 индуцируются ответы IFN типа I, а у детей, иммунизированных вакциной без адьюванта, ответы IFN типа I отсрочены и выражены слабее. Развитие ответа системы врожденного иммунитета в ранние сроки способствует индукции формирования антиген-специфических фолликулярных Т-хелперов (T_H -хелперов) через 7 суток после вакцинации, а также отмечено усиление выработки АТ у лиц, вакцинированных против вируса гриппа вакциной, содержащей MF59 [14]. В исследовании К. S. Reisinger с соавт. [60] установлено, что применение указанного адьюванта позволяет снизить дозу противогриппозной вакцины. При использовании широкого диапазона доз вакцины (от 3,75 до 30 мкг гемагглютинина) оптимальный иммунный ответ развивался при ее однократном введении в дозе, содержащей 3,75 мкг АГ A/California/7/2009 (H1N1) с адьювантом MF59, лицам взрослого населения (от 18 до 64 лет) и лицам старше 65 лет [60].

Таким образом, MF59 в качестве адьюванта способствует выработке цитокинов и хемокинов, привлечению клеток к месту инъекции. Активированные АПК, поглотившие АГ, мигрируют в дренирующие лимфатические узлы, где участвуют в примировании наивных $CD4^+$ Т-клеток. Привлечение иммунных клеток под воздействием хемокинов является ключевой характеристикой механизма действия MF59.

AS03 (масляная эмульсия)

Еще одним адьювантом, относящимся к эмульсии «масло-в-воде» на основе сквалена, является AS03, который состоит из поверхностно-активного вещества полисорбата 80 и двух биоразлагаемых масел — сквалена и DL- α -токоферола — наиболее биодоступной формы витамина E [61].

Использование AS03 в качестве адьюванта, как и MF59, способствует выработке цитокинов и хемокинов в мышцах и дренирующих лимфатических узлах, усилению миграции клеток и привлечению их к месту инъекции. AS03 также стимулирует поглощение АГ АПК, в частности МЦ и ДК, которые затем мигрируют в лимфатические узлы, где происходит презентация АГ наивным $CD4^+$ Т-клеткам. В процессах, способствующих повышению миграции иммунокомпетентных клеток, участвует и DL- α -токоферол, который обладает восстанавливающими свойствами и выступает в качестве дополнительного иммуностимулятора [14, 62]. В исследовании, проведенном на мышах, показано, что AS03 индуцирует изменения экспрессии генов хемокинов как в месте инъекции, так и в дренирующих лимфатических узлах в течение 4 ч после введения. Однако изменения, наблюдаемые в лимфатических узлах, были временными и уменьшались через сутки после инъекции. Отмечается, что этот ранний ответ в основном опосредован DL- α -токоферолом [62]. В исследованиях с использованием модели *in vivo* показано, что при отсутствии DL- α -токоферола в AS03 изменяется профиль ответа системы врожденного иммунитета и наблюдается более низкий уровень гуморального иммунного ответа. Подчеркивается, что в группе животных, иммунизированных AS03, содержащим α -токоферол, наблюдалась продукция АТ в более высоких титрах. Первичными клетками-мишенями для

DL- α -токоферола являются МЦ и МФ, которые отвечают за выработку хемокинов в ответ на введение AS03. Отмечено активирующее влияние DL- α -токоферола на экспрессию хемокинов CCL2, CCL3, CXCL1, а также IL-6 и гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора [62].

С использованием модели трансгенных мышей с репортером гена люциферазы-NF- κ B показано, что адьювант AS03 индуцирует активацию фактора транскрипции NF- κ B, однако активация NF- κ B ограничена местом инъекции и лимфатическими узлами, что указывает на развитие локализованного ответа на адьювант [13, 62]. Анализируя результаты изучения влияния адьювантов на ответ системы врожденного иммунитета при введении человеку, I. Sarkar с соавт. [14] отмечают, что MF59 и AS03 способствуют раннему развитию воспалительной реакции, что совпадает с результатами исследований, проведенных на животных.

При изучении иммуностимулирующих свойств AS03 на раннем этапе развития иммунного ответа показано, что адьювант нарушает липидный обмен в моноцитарных клетках, что приводит к индукции стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и активации ответа на развернутый белок (Unfolded protein response, UPR) [63]. Обнаружено, что дифференцировка T_H -хелперов и повышение аффинности специфических АТ зависят от ответа на UPR. На экспериментальной модели с использованием иммунодефицитных мышей, у которых отсутствует киназа IRE1 α /Ern1 в миелоидных клетках, показано, что недостаток экспрессии киназы, являющейся сенсором стрессовых сигналов ЭПР, приводит к подавлению дифференцировки наивных $CD4^+$ Т-клеток в T_H -хелперы, а также к уменьшению выработки IL-21, участвующего в образовании плазматических клеток и продукции АТ высокой аффинности. Отмечено, что недостаток IRE1 α /Ern1 в МЦ/МФ способствует снижению экспрессии IL-6, который играет решающую роль в дифференцировке клеток T_H -хелперов, а также в выработке IL-21 указанными клетками и в продукции АТ [63]. Таким образом, AS03 и MF59 в составе вакцин за счет стимуляции индукции ответа T_H -хелперов способствуют развитию более выраженного гуморального иммунного ответа по сравнению с соединениями алюминия, используемыми в качестве адьювантов [14].

Показана значимость MF59 и AS03 как адьювантов для вакцин против вируса птичьего гриппа А (H7N9). Отмечается, что после введения двух доз вакцины H7N9, содержащей 15 мкг гемагглютинина, без адьюванта, с адьювантами AS03 или MF59, гемагглютинирующие АТ в титре 1:40 были выявлены у 2, 57 и 84% в группах вакцинированных лиц соответственно [9]. В исследованиях Р. Moris с соавт. [64] установлено, что AS03 стимулирует выработку нейтрализующих АТ и развитие специфического иммунного ответа $CD4^+$ Т-лимфоцитов, способствует формированию как В-клеток, так и Т-клеток иммунологической памяти.

Моновалентная вакцина против вируса гриппа А (H5N1) с адьювантом AS03 была лицензирована FDA в 2013 г.³ [14]. В настоящее время AS03 входит в состав лицензированных вакцин против препандемического гриппа H5N1 (моновалентная вакцина) и пандемического гриппа H1N1 (трехвалентная вакцина). Вакцины, содержащие AS03 в качестве адьюванта, применялись при вакцинации в период пандемии свиного гриппа. Несмотря на результаты исследований, свидетельствующие о том, что AS03 улучшает иммуногенность вакцин, изучение механизма, опосредующего его стимулирующий эффект, продолжается.

³ Influenza A (H5N1) Virus Monovalent Vaccine, Adjuvanted. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/influenza-h5n1-virus-monovalent-vaccine-adjuvanted>

Адъювантные системы

Одним из перспективных подходов к повышению эффективности вакцин является сочетание в их рецептурном составе нескольких адъювантов. Такими примерами являются адъювантные системы ASO1 и ASO4.

ASO1 (адъювантная система), разработанная более 20 лет назад, представляет собой адъювант на основе липосом и состоит из двух иммуностимуляторов — монофосфорилированного липида А (MPL) и сапонина (QS-21) [65].

Липосомы являются синтетическими наносферами, состоящими из фосфолипидных бислоев, которые инкапсулируют АГ и выступают в качестве средств их доставки. Липосомы используются в вакцинных препаратах против гриппа, хламидиоза, малярии и туберкулеза. Отмечается, что совместное введение АГ с катионными липосомами приводит к индукции более сильного антиген-специфического иммунного ответа, чем при применении нейтральных или анионных липосом [65].

Монофосфорилированный липид А (MPL) (3-О-дезацил-4'-монофосфорилилипид А) является детоксицированным синтетическим производным липополисахарида (LPS) *Salmonella minnesota*. MPL сохраняет адъювантную активность LPS, но при этом обладает минимальной токсичностью [66].

MPL как агонист TLR4 индуцирует активацию системы врожденного иммунитета при связывании с указанным рецептором, стимулируя транскрипционную активность ядерного фактора NF-κB, что приводит к увеличению синтеза провоспалительных цитокинов и IFNγ и в дальнейшем к развитию иммунного ответа Th1. Кроме того, MPL повышает продукцию хемокинов, при этом такие хемокины, как CCL2 и CCL3, способствуют миграции в зону инъекции МЦ, МФ и ДК [65, 66].

Оказывая влияние на систему врожденного иммунитета и на формирование адаптивного иммунного ответа, адъюванты индуцируют ряд путей передачи сигналов. В экспериментальных исследованиях С. Сөкис с соавт. [67] показано, что MPL при связывании с TLR4 селективно активирует сигнальный путь MAPK p38, что индуцирует выработку фактора некроза опухоли альфа (TNFα), IL-10, IFNγ-индуцированного белка 10 (IP-10). М. Соссиа с соавт. [68] отмечают, что введение вакцин против малярии и опоясывающего герпеса с ASO1 способствует продукции IFNγ NK-клетками в лимфатических узлах и CD8⁺ Т-клетками.

Сапонин (QS-21) выделен из коры дерева *Quillaja saponaria* и является одним из наиболее эффективных адъювантов, известных в настоящее время. В доклинических исследованиях при введении мышам, морским свинкам и обезьянам QS-21 проявлял выраженный адъювантный эффект в отношении широкого круга АГ. Показано, что при добавлении в вакцину он стимулирует иммунные реакции типа Th1 и Th2 [69]. Однако механизм действия QS-21 до конца не изучен. Высказываются гипотезы о том, что QS-21 может способствовать поглощению АГ АПК путем связывания с поверхностными лектинами клеток через их углеводные домены, что приводит к активации цитокинов, усиливающих ответ Т- и (или) В-клеток [70]. Отмечается, что экзогенные АГ и QS-21 поглощаются ДК в результате холестерин-зависимого эндоцитоза, при котором высокое сродство QS-21 к эндосомальному мембранному холестерину приводит к дестабилизации мембраны и образованию пор. После процессинга АГ внутри клетки пептиды в комплексе с молекулами МНС класса I представляются на поверхности ДК наивным CD8⁺ Т-лимфоцитам, способствуя формированию цитотоксических Т-лимфоцитов [69, 70].

В исследованиях *in vitro*, проведенных с использованием АПК мышей (ДК и МФ), QS-21 охарактеризован как активатор инфламматомы NLRP3. Показано, что QS-21 в сочетании с MPL активирует белковый комплекс ACS-NLRP3, что вызывает индукцию синтеза провоспалительных цитокинов IL-1β/IL-18, которые способствуют созреванию клеток Th17 или формированию ответа Th1, опосредованного IFN, соответственно. Однако в условиях *in vivo* стимулирующего действия QS-21 в активации NLRP3 не наблюдалось [71]. Отмечается, что QS-21 в составе липосом активирует ДК человека, стимулируя холестерин-зависимый эндоцитоз с последующей дестабилизацией липосом и активацией тирозинкиназы Syk, которая участвует в передаче сигналов от мембранных рецепторов, включая В-клеточный рецептор, а также в регуляции иммунного ответа [31].

При введении мышам поверхностного антигена гепатита В HBsAg в сочетании с адъювантной системой ASO1 отмечена ранняя продукция IFNγ, пик концентрации которого (300 пг/мл) наблюдался через 6 ч после иммунизации, в то время как отдельно взятые MPL или QS-21 не индуцировали аналогичный уровень продукции IFNγ. Вероятно, стимулирующий эффект ASO1 является результатом синергетического действия MPL/QS-21. С. Сөкис с соавт. [67] подчеркивают, что активация провоспалительных сигнальных путей имеет потенциальные возможности для индукции развития Т-хелперов определенной направленности. Однако определение роли этих путей передачи сигналов при развитии иммунного ответа в организме человека требует дальнейшего изучения.

В публикации М. А. Lacaille-Dubois [72] отмечается, что адъювантный эффект сапонина зависит от MyD88-опосредованного сигнального пути рецептора IL-18. По мнению автора, ASO1 эффективен при стимуляции иммунного ответа, опосредованного CD4⁺ Т-клетками, и является перспективным адъювантом для включения в вакцины против различных вирусных инфекций. Усиление выраженности адаптивного иммунного ответа под влиянием ASO1 зависит от синергетического эффекта QS-21 и MPL [72].

Обобщая результаты изучения механизма действия QS-21, можно заключить, что его стимулирующее влияние на развитие гуморального и клеточного иммунного ответа опосредовано:

- воздействием на АПК и Т-клетки, что приводит к активации синтеза цитокинов Th1 и способствует элиминации внутриклеточных патогенов;
- активацией инфламматомы NLRP3 в АПК и последующей продукции цитокинов IL-1β и IL-18, важных для развития ответа Th1;
- синергетическим эффектом MPL и QS-21, инкапсулированных в липосоме, проявляющимся в раннем ответе IFNγ, что способствует повышению иммуногенности вакцины [73].

Несмотря на то что адъювантные свойства QS-21 изучались на этапе клинических исследований многих вакцин, адъювантная система ASO1 входит в состав только двух вакцин, зарегистрированных EMEA: против малярии (Mosquirix™) и опоясывающего герпеса (Shingrix™), разработанных компанией GlaxoSmithKline⁴ [74].

Исследования безопасности и эффективности вакцины Mosquirix™ свидетельствуют о том, что у детей 5–17 месяцев и младенцев 6–12 недель после первых трех инъекций в течение последующих 18 месяцев были предотвращены случаи развития тяжелого течения малярии [75].

Инфицирование *Herpes zoster* может привести к серьезным осложнениям, включая постгерпетическую невралгию. На

⁴ Mosquirix H-W-2300. EMA. <https://www.ema.europa.eu/en/mosquirix-h-w-2300>
Shingrix. EMA. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/shingrix>

основании результатов исследований фазы I/II показано, что субъединичная вакцина, содержащая рекомбинантный гликопротеин Е вируса ветряной оспы в качестве АГ и адьювантную систему AS01, хорошо переносится и обладает высокой иммуногенностью, индуцируя развитие клеточно-опосредованного и гуморального иммунного ответа. В 2017 г. FDA лицензировало вакцину Shingrix™, которая при введении человеку обеспечивает более сильную защиту от *H. zoster* по сравнению с живой аттенуированной вакциной Zostavax® [76].

Впервые введенная в клиническую практику в 1921 г. вакцина Bacillus Calmette-Guérin (BCG) является единственной в настоящее время лицензированной вакциной от туберкулеза. Она защищает детей от менингеальных и тяжелых форм туберкулеза с летальным исходом, но имеет ограниченные возможности для защиты подростков и взрослых от легочной формы туберкулеза, что является основной причиной высокого уровня заболеваемости и смертности этой возрастной группы населения. Существует острая необходимость в создании новой улучшенной вакцины против возбудителя этого заболевания, которое стало причиной глобальной угрозы для здоровья человечества. Новая разрабатываемая вакцина M72/AS01 содержит рекомбинантный белок слияния, полученный из двух АГ *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb32A и Mtb39A) и AS01. Анализ результатов клинического исследования I/II фазы M72/AS01 показал, что вакцина клинически хорошо переносится, отмечено формирование выраженного ответа специфических CD4⁺ Т-клеток типа Th1, ко-экспрессирующих CD40L, IL-2, INFα и INFγ, а также отмечена выработка специфических АТ в высоких титрах. В клиническом исследовании IIb фазы, проведенном на ВИЧ-инфицированных взрослых, латентно инфицированных *M. tuberculosis*, показано, что M72/AS01 обеспечивает защиту от активного туберкулеза легких у 54% лиц данной группы [77]. Указанные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшей оценки вакцины M72/AS01 с целью изучения возможности ее использования для борьбы с туберкулезом.

Таким образом, MPL активирует АПК через TLR4; QS-21 активирует инфламмосому NLRP3, что индуцирует синтез IL-1β и IL-18. При этом MPL и QS-21 действуют синергетически, увеличивая выработку хемокинов, стимулируя миграцию МЦ и ДК. В лимфатических узлах активированные ДК индуцируют дифференцировку наивных CD4⁺ Т-клеток в CD4⁺ Т-клетки памяти и CD4⁺ Т-эффекторные клетки. Цитокины, секретируемые CD4⁺ Т-эффекторными клетками, стимулируют дифференцировку наивных В-клеток в плазматические клетки и В-клетки памяти.

AS04 (адьювантная система). Соединения алюминия использовались в качестве платформы для разработки и изучения новых адьювантов, состоящих из сорбированных на них различных агонистов TLRs. К таким адьювантам относится AS04, который содержит MPL, адсорбированный на гидроксиде алюминия. В настоящее время зарегистрированы две вакцины, содержащие AS04: бивалентная вакцина против вируса папилломы человека (HPV) (Cervarix®) (зарегистрирована в Российской Федерации), которая является первой вакциной с адьювантом AS04, и вакцина против вируса гепатита В (HBV) (Fendrix), рекомендуемая для вакцинации пациентов, находящихся на гемодиализе (зарегистрирована EMEA)⁵ [74].

Показано, что MPL способствует развитию иммунного ответа в более ранние сроки. После введения экспериментальным животным MPL или AS04 через 3–6 ч в месте инъекции отмечена индукция синтеза цитокинов, которые усиливают миграцию различных иммунных клеток и их привлечение в мыш-

цы и дренирующие лимфатические узлы [31]. Отмечается, что гидроксид алюминия не обладает синергетическим действием с MPL, его присутствие важно для повышения продолжительности иммунного ответа за счет эффекта депо, а также для стабилизации MPL и АГ в вакцине [66].

AS04 способствует развитию местной воспалительной реакции, участвует в активации транскрипционного фактора NF-κB, стимулирует продукцию цитокинов. Для проявления адьювантной активности AS04 в индукции оптимального иммунного ответа необходимо его совместное локальное введение с АГ одновременно или в течение 24 ч [31, 66]. Это способствует увеличению количества активированных МЦ и ДК, нагруженных АГ, в дренирующих лимфатических узлах, созреванию ДК, которые активируют наивные Т-клетки [66]. В целом эти результаты свидетельствуют о том, что адсорбция MPL на гидроксиде алюминия усиливает иммунный ответ на вакцину за счет быстрого запуска секреции цитокинов в месте инъекции и оптимальной активации АПК.

AS04 является эффективным адьювантом, опосредующим также развитие и гуморального иммунного ответа. В публикации G. Del Giudice [31] отмечается, что у человека при использовании AS04 в качестве адьюванта в вакцинах против вируса гепатита В и вируса папилломы человека вместо одного гидроксида алюминия индуцируется более высокий уровень АТ, что указывает на адьювантный эффект MPL.

Известно, что соединения алюминия не индуцируют развитие ответа CD8⁺ Т-клеток. Однако в сочетании с MPL гидроксид алюминия способствует формированию ответа Th1, как это выявлено при применении AS04 [66]. При введении АГ вирусоподобных частиц белка L1 вируса папилломы человека (HPV-16 и HPV-18) с AS04 отмечен более высокий уровень синтеза IFNγ, маркера иммунного ответа Th1, а также IL-2 по сравнению с использованием только гидроксида алюминия в качестве адьюванта [78, 79]. Вероятно, AS04 более эффективен в индукции механизмов, направляющих дифференцировку CD4⁺ Т-клеток, что способствует развитию ответа Th1 [1]. В связи с этим преимуществом AS04 при его включении в состав вакцин является индукция развития выраженных иммунных реакций Th1 [77].

Агонисты TLRs, используемые в качестве адьювантов, повышают экспрессию поверхностных маркеров на В-клетках, участвующих в презентации АГ (молекулы МНС классов I и II), и костимулирующих молекул, участвующих во взаимодействии с Т-клетками (CD40, CD80 и CD86), что способствует повышению продукции специфических АТ [80]. При введении вакцины против HPV с адьювантом AS04 наблюдалось формирование нейтрализующих АТ в высоких титрах на слизистой оболочке шейки матки у женщин в возрасте 15–55 лет. Значимость вклада MPL в адьювантный эффект AS04 для указанной вакцины подтверждена результатами клинических исследований, согласно которым показано, что адьювант стимулирует образование специфических АТ и способствует формированию В-клеток памяти. Отмечается, что вакцина вызывает перекрестную защиту от некоторых других онкогенных вирусов типов HPV (в частности, HPV-31, 33 и 45), не содержащихся в вакцине [81, 82].

У пациентов, находящихся на гемодиализе, не формируется напряженный иммунитет при вакцинации, в том числе и против HBV. Новая рекомбинантная вакцина против HBV, содержащая в своем составе AS04 в качестве адьюванта (HBV-AS04), отличается более высокой иммуногенностью при применении в указанной группе вакцинируемых лиц. Отмечается, что переносимость HBV-AS04 была удовлетворительной, проявление побочного действия наблюдалось в незначительной степени [83].

⁵ Fendrix. EMA. www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/fendrix

Заключение

Одним из наиболее важных вопросов при разработке эффективных и безопасных вакцин является выбор подходящего адъюванта, который обладает выраженным иммуногенным потенциалом и отвечает требованиям безопасности при использовании в медицинской практике. Лучшим адъювантом считается тот, который способствует развитию наиболее выраженного специфического иммунного ответа и представляет наименьший риск для здоровья человека.

Важным этапом в создании безопасных и эффективных адъювантов является разработка масляных эмульсий (например, MF59) и адъювантных систем (например, комбинация гидроксида алюминия и MPL (AS04)), которые успешно использовались при вакцинации миллионов людей. Указанные адъюванты могут рассматриваться в качестве платформы для разработки составов следующего поколения адъювантов, таких как эмульсии на основе синтетических, дрожжевых или растительных масел и адъюванты на основе синтетических лигандов TLR4. Такие достижения расширяют доступность определенных адъювантов с более понятным механизмом действия, которые могут быть получены в промышленных масштабах.

Понимание механизмов действия существующих адъювантов требует дальнейшего совершенствования, поскольку имеет решающее значение для использования потенциала существующих и новых адъювантов в стимуляции развития оптимального иммунного ответа против различных возбудителей инфекции.

Во второй части статьи будут представлены данные, касающиеся характеристики и механизмов действия таких адъювантов, как синтетический олигодезоксирибонуклеотид, содержащий последовательности цитозина-гуанина (CpG 1018), вирусомы, полиоксидоний, совидон, также входящих в состав зарегистрированных вакцин. Кроме того, будут обобщены сведения об эффектах адъювантов, используемых в исследованиях по разработке вакцин против коронавирусов SARS-CoV и MERS-CoV.

Окончание следует.

Вклад авторов. *Н. А. Алпатова* — написание, доработка текста рукописи; *Ж. И. Авдеева* — идея исследования, обобщение материала и формулировка выводов исследования; *С. Л. Лысикова* — сбор и систематизация данных; *О. В. Головинская* — концепция и дизайн исследования; *Л. А. Гайдерова* — окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. *Natalia A. Alpatova*—writing, revising the text; *Zhanna I. Avdeeva*—proposing the idea of the study, consolidation of data, formulation of study findings; *Svetlana L. Lysikova*—data collection and systematisation; *Olga V. Golovinskaya*—elaboration of the study concept and design; *Lidia A. Gayderova*—final approval of the paper version to be published.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР ААААА18-118021590046-9).

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. Ж. И. Авдеева является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Zhanna I. Avdeeva is a member of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

- Shi S, Zhu H, Xia X, Liang Z, Ma X, Sun B. Vaccine adjuvants: understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*. 2019;37(24):3167–78. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.055>
- 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.)]
- Chan EH, Brewer TF, Madoff LC, Pollack MP, Sonrick AL, Keller M, et al. Global capacity for emerging infectious disease detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(50):21701–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006219107>
- WHO Ebola Response Team, Aylward B, Barboza P, Bawo L, Bertherat E, Bilivogui P, et al. Ebola virus disease in West Africa — the first 9 months of the epidemic and forward projections. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1481–95. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411100>
- Gupta T, Gupta SK. Potential adjuvants for the development of a SARS-CoV-2 vaccine based on experimental results from similar coronaviruses. *Int Immunopharmacol*. 2020;86:106717. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106717>
- Falsey AR, Treanor JJ, Tornieporth N, Capellan J, Gorse GJ. Randomized, double-blind controlled phase 3 trial comparing the immunogenicity of high-dose and standard-dose influenza vaccine in adults 65 years of age and older. *J Infect Dis*. 2009;200(2):172–80. <https://doi.org/10.1086/599790>
- Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 2010;28(Suppl 3):25–36. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.021>
- Banzhoff A, Gasparini R, Laghi-Pasini F, Staniscia T, Durando P, Montomoli E, et al. MF59-adjuvanted H5N1 vaccine induces immunologic memory and heterotypic antibody responses in non-elderly and elderly adults. *PLoS ONE*. 2009;4(2):e4384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004384>
- Jackson LA, Campbell JD, Frey SE, Edwards KM, Keitel WA, Kotloff KL, et al. Effect of varying doses of a monovalent H7N9 influenza vaccine with and without AS03 and MF59 adjuvants on immune response: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2015;314(3):237–46. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.7916>
- 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>
- Powell BS, Andrianov AK, Fusco PC. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes. *Clin Exp Vaccine Res*. 2015;4(1):23–45. <https://doi.org/10.7774/cevr.2015.4.1.23>
- 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>
- Harandi AM. Systems analysis of human vaccine adjuvants. *Semin Immunol*. 2018;39:30–4. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.08.001>
- Sarkar I, Garg R, van Drunen Littel-van den Hurk S. Selection of adjuvants for vaccines targeting specific pathogens. *Expert Rev Vaccines*. 2019;18(5):505–21. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1604231>
- Alving CR, Matyas GR, Torres O, Jalah R, Beck Z. Adjuvants for vaccines to drugs of abuse and addiction. *Vaccine*. 2014;32(42):5382–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.085>
- HogenEsch H, O'Hagan DT, Fox CB. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. *NPJ Vaccines*. 2018;3:51. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0089-x>

17. He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(2):477–88. <https://doi.org/10.1080/21645515.2014.1004026>
18. Trier NH, Güven E, Skogstrand K, Ciplys E, Slibinskas R, Houen G. Comparison of immunological adjuvants. *APMIS.* 2019;127(9):635–41. <https://doi.org/10.1111/apm.12976>
19. Glennly AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U. Immunology notes. XXIII. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol.* 1926;29:31–40. <http://dx.doi.org/10.1002/path.1700290106>
20. Awate S, Babuik LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol.* 2013;4:114. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00114>
21. Aimaniana V, Haensler J, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(6):287–95. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.03.005>
22. Ghimire TR, Benson RA, Garside P, Brewer JM. Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. *Immunol Lett.* 2012;147(1-2):55–62. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.06.002>
23. Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan DT, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine.* 2011;29(9):1812–23. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.12.090>
24. Lu F, Hogenesch H. Kinetics of the inflammatory response following intramuscular injection of aluminum adjuvant. *Vaccine.* 2013;31(37):3979–86. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.107>
25. 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>
26. Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, Pollock AH, Garside P, Brewer JM. Antigen depot is not required for alum adjuvant activity. *FASEB J.* 2012;26(3):1272–9. <https://doi.org/10.1096/fj.11-184556>
27. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 2008;9(8):847–56. <https://doi.org/10.1038/ni.1631>
28. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature.* 2008;453(7198):1122–6. <https://doi.org/10.1038/nature06939>
29. Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol.* 2008;181(1):17–21. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.17>
30. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(4):287–93. <https://doi.org/10.1038/nri2510>
31. Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM. Correlates of adjuvant activity: a review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin Immunol.* 2018;39:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001>
32. Franchi L, Núñez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol.* 2008;38(8):2085–9. <https://doi.org/10.1002/eji.200838549>
33. McKee AS, Munks MW, MacLeod MKL, Fleenor CJ, Van Rooijen N, Kappler JW, Marrack P. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J Immunol.* 2009;183(7):4403–14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900164>
34. Flach TL, Ng G, Hari A, Desrosiers MD, Zhang P, Ward SM, et al. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvant activity. *Nat Med.* 2011;17(4):479–87. <https://doi.org/10.1038/nm.2306>
35. Kool M, Soullié T, van Nimwegen M, Willart MAM, Muskens F, Jung S, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med.* 2008;205(4):869–82. <https://doi.org/10.1084/jem.20071087>
36. Liang F, Lindgren G, Sandgren KJ, Thompson EA, Francica JR, Seubert A, et al. Vaccine priming is restricted to draining lymph nodes and controlled by adjuvant-mediated antigen uptake. *Sci Transl Med.* 2017;9(393):eaal2094. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal2094>
37. Kooijman S, Brummelman J, van Els CACM, Marino F, Heck AJR, Mommen GPM, et al. Novel identified aluminum hydroxide-induced pathways prove monocyte activation and pro-inflammatory preparedness. *J Proteomics.* 2018;175:144–55. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.12.021>
38. Kooijman S, Brummelman J, van Els CACM, Marino F, Heck AJR, van Riet E, et al. Vaccine antigens modulate the innate response of monocytes to Al(OH) $_3$. *PLoS One.* 2018;13(5):e0197885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197885>
39. Hogenesch H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminium adjuvants. *Vaccine.* 2002;20(Suppl 3):S34–9. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00169-X)
40. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med.* 2011;17(8):996–1002. <https://doi.org/10.1038/nm.2403>
41. McKee AS, Burchill MA, Munks MW, Jin L, Kappler JW, Friedman RS, et al. Host DNA released in response to aluminum adjuvant enhances MHC class II-mediated antigen presentation and prolongs CD4 T-cell interactions with dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(12):E1122–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300392110>
42. Stephen J, Scales HE, Benson RA, Erben D, Garside P, Brewer JM. Neutrophil swarming and extracellular trap formation play a significant role in Alum adjuvant activity. *NPJ Vaccines.* 2017;2:1. <https://doi.org/10.1038/s41541-016-0001-5>
43. Mori A, Oleszycka E, Sharp FA, Coleman M, Ozasa Y, Singh M, et al. The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses. *Eur J Immunol.* 2012;42(10):2709–19. <https://doi.org/10.1002/eji.201242372>
44. Oleszycka E, McCluskey S, Sharp FA, Muñoz-Wolf N, Hams E, Gorman AL, et al. The vaccine adjuvant alum promotes IL-10 production that suppresses Th1 responses. *Eur J Immunol.* 2018;48(4):705–15. <https://doi.org/10.1002/eji.201747150>
45. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol.* 2009;183(10):6186–97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901474>
46. Ebensen T, Delandre S, Prochnow B, Guzmán CA, Schulze K. The combination vaccine adjuvant system alum/c-di-AMP results in quantitative and qualitative enhanced immune responses post immunization. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:31. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00031>
47. Orr MT, Khandhar AP, Seydoux E, Liang H, Gage E, Mikasa T, et al. Reprogramming the adjuvant properties of aluminum

- oxyhydroxide with nanoparticle technology. *NPJ Vaccines*. 2019;4:1. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0094-0>
48. Ko EJ, Kang SM. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14(12):3041–5. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1495301>
49. Zedda L, Forleo-Neto E, Vertruyen A, Raes M, Marchant A, Jansen W, et al. Dissecting the immune response to MF59-adjuvanted and nonadjuvanted seasonal influenza vaccines in children less than three years of age. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(1):73–8. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0000000000000465>
50. O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, Rappuoli R, Giudice GD. The history of MF59[®] adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(1):13–30. <https://doi.org/10.1586/erv.12.140>
51. Seubert A, Calabro S, Santini L, Galli B, Genovese A, Valentini S, et al. Adjuvanticity of the oil-in-water emulsion MF59 is independent of Nlrp3 inflammasome but requires the adaptor protein MyD88. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(27):11169–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107941108>
52. Vono M, Taccone M, Caccin P, Gallotta M, Donvito G, Falzoni S, et al. The adjuvant MF59 induces ATP release from muscle that potentiates response to vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(52):21095–100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319784110>
53. 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):10501–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804699105>
54. Seubert A, Monaci E, Pizza M, O'Hagan DT, Wack A. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *J Immunol*. 2008;180(8):5402–12. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5402>
55. De Gregorio E, Caproni E, Ulmer JB. Vaccine adjuvants: mode of action. *Front Immunol*. 2013;4:214. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00214>
56. Cioncada R, Maddaluno M, Vo HTM, Woodruff M, Tavarini S, Sammicheli C, et al. Vaccine adjuvant MF59 promotes the intranodal differentiation of antigen-loaded and activated monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185843>
57. Ko EJ, Lee YT, Kim KH, Jung YJ, Lee Y, Denning TL, Kang SM. Effects of MF59 adjuvant on induction of isotype-switched IgG antibodies and protection after immunization with T-dependent influenza virus vaccine in the absence of CD4⁺ T cells. *J Virol*. 2016;90(15):6976–88. <https://doi.org/10.1128/JVI.00339-16>
58. Ko EJ, Lee YT, Kim KH, Lee Y, Jung YJ, Kim MC, et al. Roles of aluminum hydroxide and monophosphoryl lipid A adjuvants in overcoming CD4⁺ T cell deficiency to induce isotype-switched IgG antibody responses and protection by T-dependent influenza vaccine. *J Immunol*. 2017;198(1):279–91. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600173>
59. Pittman PR. Aluminum-containing vaccine associated adverse events. Role of route of administration and gender. *Vaccine*. 2002;20(Suppl 3):S48–50. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00172-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00172-x)
60. Reisinger KS, Holmes SJ, Pedotti P, Arora AK, Lattanzi M. A dose-ranging study of MF59[®]-adjuvanted and non-adjuvanted A/H1N1 pandemic influenza vaccine in young to middle-aged and older adult populations to assess safety, immunogenicity, and antibody persistence one year after vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(8):2395–407. <https://doi.org/10.4161/hv.29393>
61. Garçon N, Vaughn DW, Didierlaurent AM. Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing α -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(3):349–66. <https://doi.org/10.1586/erv.11.192>
62. Morel S, Didierlaurent A, Bourguignon P, Delhaye S, Baras B, Jacob V, et al. Adjuvant system AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine*. 2011;29(13):2461–73. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.011>
63. Givord C, Welsby I, Detienne S, Thomas S, Assabban A, Lima Silva V, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 α by the vaccine adjuvant AS03 contributes to its immunostimulatory properties. *NPJ Vaccines*. 2018;3:20. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0058-4>
64. Moris P, van der Most R, Leroux-Roels I, Clement F, Dramé M, Hanon E, et al. H5N1 influenza vaccine formulated with AS03_A induces strong cross-reactive and polyfunctional CD4 T-cell responses. *J Clin Immunol*. 2011;31(3):443–54. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9490-6>
65. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol*. 2004;82(5):488–96. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x>
66. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol*. 2009;183(10):6186–97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901474>
67. Cekic C, Casella CR, Eaves CA, Matsuzawa A, Ichijo H, Mitchell TC. Selective activation of the p38 MAPK pathway by synthetic monophosphoryl lipid A. *J Biol Chem*. 2009;284(46):31982–91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.046383>
68. Coccia M, Collignon C, Hervé C, Chalon A, Welsby I, Detienne S, et al. Cellular and molecular synergy in AS01-adjuvanted vaccines results in an early IFN γ response promoting vaccine immunogenicity. *NPJ Vaccines*. 2017;2:25. <https://doi.org/10.1038/s41541-017-0027-3>
69. Mastelic B, Ahmed S, Egan WM, Del Giudice G, Golding H, Gust I, et al. Mode of action of adjuvants: implications for vaccine safety and design. *Biologicals*. 2010;38(5):594–601. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2010.06.002>
70. Marciani DJ. Elucidating the mechanisms of action of saponin-derived adjuvants. *Trends Pharm Sci*. 2018;39(6):573–85. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.005>
71. Marty-Roix R, Vladimer GI, Pouliot K, Weng D, Buglione-Corbett R, West K, et al. Identification of QS-21 as an inflammasome-activating molecular component of saponin adjuvants. *J Biol Chem*. 2016;291(3):1123–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683011>
72. Laccaille-Dubois MA. Updated insights into the mechanism of action and clinical profile of the immunoadjuvant QS-21: A review. *Phytomedicine*. 2019;60:152905. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152905>
73. Didierlaurent AM, Laupèze B, Di Pasquale A, Hergli N, Collignon C, Garçon N. Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16(1):55–63. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1213632>
74. Garçon N, Chomez P, Van Mechelen M. GlaxoSmithKline adjuvant systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Rev Vaccines*. 2007;6(5):723–39. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.5.723>
75. Laurens MB. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix[™]): an overview. *Hum Vaccin Immunother*. 2020;16(3):480–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1669415>
76. Leroux-Roels I, Leroux-Roels G, Clement F, Vandepapelière P, Vassilev V, Ledent E, Heineman TC. A phase 1/2 clinical trial evaluating safety and immunogenicity of a varicella zoster glycoprotein E subunit vaccine candidate in young and older adults. *J Infect Dis*. 2012;206(8):1280–90. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis497>

77. Van der Meeren O, Hatherill M, Nduba V, Wilkinson RJ, Muyoyeta M, Van Brakel E, et al. Phase 2b controlled trial of M72/AS01_E vaccine to prevent tuberculosis. *N Engl J Med*. 2018;379(13):1621–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1803484>
78. Burny W, Callegaro A, Bechtold V, Clement F, Delhaye S, Fissette L, et al. Different adjuvants induce common innate pathways that are associated with enhanced adaptive responses against a model antigen in humans. *Front Immunol*. 2017;8:943. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00943>
79. Giannini SL, Hanon E, Moris P, Van Mechelen M, Morel S, Dessy F, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*. 2006;24(33-34):5937–49. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.005>
80. Keam SJ, Harper DM. Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted adsorbed) [Cervarix™]. *Drugs*. 2008;68(3):359–72. <https://doi.org/10.2165/00003495-200868030-00007>
81. Toussi DN, Massari P. Immune adjuvant effect of molecularly-defined toll-like receptor ligands. *Vaccines (Basel)*. 2014;2(2):323–53. <https://doi.org/10.3390/vaccines2020323>
82. Garçon N, Morel S, Didierlaurent A, Descamps D, Wettendorff M, Van Mechelen M. Development of an AS04-adjuvanted HPV vaccine with the adjuvant system approach. *BioDrugs*. 2011;25(4):217–26. <https://doi.org/10.2165/11591760-000000000-00000>
83. Fabrizi F, Tarantino A, Castelnovo C, Martín P, Messa P. Recombinant Hepatitis B vaccine adjuvanted with as04 in dialysis patients: a prospective cohort study. *Kidney Blood Press Res*. 2015;40(6):584–92. <https://doi.org/10.1159/000368534>

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>

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

Головинская Ольга Вячеславовна, канд. мед. наук. *Olga V. Golovinskaya*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6966-9859>

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

Поступила 14.09.2020

После доработки 28.10.2020

Принята к публикации 04.12.2020

Received 14 September 2020

Revised 28 October 2020

Accepted 4 December 2020

Разработка и валидация методики определения концентрации антитела человека, блокирующего связывание PD-1 с лигандами, в сыворотке крови яванского макака методом биослойной интерферометрии

К. В. Ульянова, А. А. Казаров, М. С. Пантюшенко, А. А. Оленев, И. В. Лягоскин, В. М. Симонов*

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

Целью некоторых видов иммунотерапии злокачественных опухолей является восстановление способности Т-клеток распознавать и уничтожать опухолевые клетки. Сверхэкспрессия лиганда запрограммированной клеточной смерти (PD-L1) распространена во многих опухолях человека и связана с плохим прогнозом для пациента. Разработка моноклональных антител, специфичных к PD-L1 или PD-1, является перспективным направлением в иммунотерапии злокачественных новообразований. Однако прежде чем лекарственный препарат на основе терапевтического антитела появится на фармацевтическом рынке, необходимо убедиться в его безопасности и эффективности, то есть провести доклинические и клинические исследования в полном объеме. **Цель работы:** разработать и валидировать биоаналитическую методику, позволяющую без внесения дополнительных меток определить концентрацию моноклонального антитела, специфичного к PD-1 человека, в сыворотке крови биологической тест-системы в ходе проведения доклинических исследований. **Материалы и методы:** в работе использовали антиген в виде димера внеклеточного домена рецептора PD-1, ковалентно связанного с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека (R&D Systems, США). Антиген иммобилизовали на биосенсоры Dip and Read™ Protein A (Fortebio, США). Терапевтическое моноклональное анти-PD-1 антитело GNR-051 произведено в ООО «МБЦ «Генериум» (Россия). Используемые в качестве матрицы образцы сыворотки крови здоровых яванских макаков получены в ФГБНУ «НИИ МП» (г. Сочи, Россия). Оценку связывания проводили с помощью интерферометра Octet® QKe (Fortebio, США) в режиме наблюдения в реальном времени дозозависимой скорости формирования комплекса антиген–антитело. **Результаты:** представлены экспериментальные данные по разработке и валидации методики определения концентрации препарата моноклонального терапевтического антитела, связывающегося с клеточным рецептором PD-1, в сыворотке крови яванского макака в диапазоне концентраций антитела 2–2500 мкг/мл. Проведена оценка устойчивости параметров градуировочной кривой, оценка правильности и прецизионности между опытами и внутри опыта, оценка линейности разведения, исследована специфичность и селективность методики. **Выводы:** разработана и валидирована методика определения концентрации препарата моноклонального терапевтического антитела на основе биослойной интерферометрии. Показано соответствие методики требованиям нормативных документов ЕврАзЭС по основным валидационным характеристикам: аналитическому диапазону, правильности, прецизионности и селективности.

Ключевые слова: моноклональное антитело; клеточный рецептор PD-1; лиганд запрограммированной клеточной смерти (PD-L1); биослойная интерферометрия; валидация биоаналитической методики

Для цитирования: Ульянова КВ, Казаров АА, Пантюшенко МС, Оленев АА, Лягоскин ИВ, Симонов ВМ. Разработка и валидация методики определения концентрации антитела человека, блокирующего связывание PD-1 с лигандами, в сыворотке крови яванского макака методом биослойной интерферометрии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(4):257–267. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-257-267>

* **Контактное лицо:** Симонов Владимир Михайлович; simonov@ibcgenerium.ru

Development and Validation of a Biolayer Interferometry Method for Determination of Human Anti-PD-1 Monoclonal Antibody Concentration in Cynomolgus Serum

K. V. Ulyanova, A. A. Kazarov, M. S. Pantyushenko, A. A. Olenev, I. V. Lyagoskin, V. M. Simonov*

International Biotechnology Center “Generium”, 14 Vladimirskaya St., Volginsky town, Petushinskiy District, Vladimir Oblast 601125, Russian Federation

Some types of immunotherapy of malignant tumours are aimed at restoration of T-cells' ability to recognize and eliminate cancer. Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) overexpression is characteristic of many human tumours and is associated with poor prognosis for patients. The development of monoclonal antibodies (mAbs) specific for PD-L1 or PD-1 is a promising area of immunotherapy of malignant tumours. However, before a therapeutic antibody-based product enters the market, it is necessary to ensure its safety and efficacy, i.e. perform a full scope of preclinical and clinical studies. **The aim of the study** was to develop and validate a bioanalytical method that does not require additional labeling and that could be used for determination of mAbs specific for human PD-L1 in the blood serum of a biological test system during preclinical studies. **Materials and methods:** an antigen in the

form of a dimer of PD-1 extra-cellular domain covalently bonded to the Fc-fragment of human IgG (R&D Systems, USA) was used in the study. The antigen was immobilised on Dip and Read™ Protein A biosensors (Fortebio, USA). The therapeutic anti-PD-1 antibody GNR-051 was developed and produced by IBC “Generium” (Russia). The healthy cynomolgus monkey serum samples used as matrix were obtained from the Research Institute of Medical Primatology (Sochi, Russia). The assessment of binding was performed using Octet® QKe interferometer (Fortebio, USA) by real-time analysis of the dose-dependent rate of the antigen-antibody complex formation. **Results:** the paper presents experimental data on the development and validation of the test method for determination of the therapeutic PD-1-binding mAb concentration in cynomolgus monkey serum in the antibody concentration range from 2 to 2500 µg/mL. The authors assessed the calibration curve reliability, between-run and within-run precision and accuracy, dilution linearity, specificity and selectivity of the test method. **Conclusions:** the authors developed and validated the biolayer interferometry-based method for determination of therapeutic mAbs concentration. The method was shown to comply with the Eurasian Economic Union’s regulatory requirements in terms of the main validation parameters: analytical range, accuracy, precision, and selectivity.

Key words: monoclonal antibody; PD-1 cell receptor; programmed cell death ligand-1 (PD-L1); biolayer interferometry; bioanalytical method validation

For citation: Ulyanova KV, Kazarov AA, Pantyushenko MS, Olenev AA, Lyagoskin IV, Simonov VM. Development and validation of a biolayer interferometry method for determination of human anti-PD-1 monoclonal antibody concentration in cynomolgus serum. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):257–267. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-257-267>

* **Corresponding author:** Vladimir M. Simonov; simonov@ibcgenerium.ru

Развитие злокачественных новообразований часто влечет за собой различные иммунные нарушения, в том числе клеточную иммунную дисфункцию, дефицит презентации антигена и дефекты продукции цитокинов. Поэтому восстановление функций иммунной системы представляется одним из перспективных методов терапии онкологических заболеваний. Иммуноterapia является специфическим подходом к элиминации опухолевых клеток путем регуляции активности иммунной системы пациента [1]. На сегодня все большее внимание уделяется изучению клинической эффективности не только терапии вакцинами, но и иммунотерапевтическими моноклональными антителами, специфичными к белкам контрольных точек иммунной системы (Immune checkpoint proteins): CTLA-4, PD-1 и PD-L1. Эти белки контролируют баланс специфической иммунной системы, в том числе обеспечивая защиту клеток собственного организма от гуморальных и клеточных аутоиммунных реакций [2].

Одно из ключевых звеньев системы контрольных точек представлено клеточным рецептором PD-1 (Programmed cell death protein 1) на поверхности Т-лимфоцитов и его лигандами — PD-L1 и PD-L2, в норме экспрессирующимися на поверхности макрофагов и дендритных клеток. Гиперэкспрессия PD-L1 опухолевыми клетками защищает их, подавляя активность Т-лимфоцитов. Соответственно, избирательное ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 в микроокружении опухоли снимает эту защиту, делая опухолевые клетки уязвимыми к цитотоксическим реакциям [3, 4].

Первыми одобренными Food and Drug Administration (FDA) терапевтическими антителами, блокирующими связывание рецептора PD-1 с лигандами PD-L1/PD-L2, были ниволумаб, пембролизумаб и атезолизумаб. Эти антитела показали высокую эффективность для лечения многих видов опухолей [4, 5]. Таким образом, разработка нового эффективного терапевтического антитела, модулирующего иммунный ответ, предоставляет дополнительные возможности в лечении широкого спектра онкологических заболеваний. Молекула GNR-051, представляющая собой полностью человеческое моноклональное антитело, специфичное к PD-1, является инновационным проектом ООО «МБЦ «Генериум».

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85. Приложение № 6. Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов.

Для оценки параметров фармакокинетики, которая проводится в ходе доклинических исследований эффективности и безопасности лекарственного препарата, необходимо определение концентрации препарата в крови или другом биологическом материале организма с использованием валидированной биоаналитической методики¹. Для количественного определения терапевтических антител обычно применяют иммунохимические методы, разработку которых выполняют с учетом структурных и функциональных особенностей антитела и антигена, а также свойств биологической матрицы (то есть совокупности веществ, присутствующих в биологическом образце, помимо определяемого антитела).

Цель работы — разработать и валидировать биоаналитическую методику, позволяющую без внесения дополнительных меток определить концентрацию моноклонального антитела, специфичного к PD-1 человека, в сыворотке крови биологической тест-системы в ходе проведения доклинических исследований.

Материалы и методы

Материалы

Для разработки и валидации методики использовали антиген (кат. № 1086-PD, R&D Systems, США) в виде димера внеклеточного домена рецептора PD-1 человека, ковалентно связанного с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека. Антиген иммобилизовали на коммерчески доступные биосенсоры Dip and Read™ Protein A (Fortebio, США). GNR-051 — моноклональное полностью человеческое антитело подкласса IgG2, специфичное к PD-1 человека (является инновационным проектом ООО «МБЦ «Генериум»). Сыворотка крови, используемая в исследовании, была получена из образцов крови, отобранных у 10 здоровых яванских макаков (самцы и самки в возрасте 1,5–3 года) (Cynomolgus monkey — англ., *Macaca fascicularis* — лат.) в испытательном центре ФГБНУ «НИИ МП» (г. Сочи, Россия). Образцы сыворотки крови были однократно заморожены и хранились при температуре не выше минус 70 °С до начала проведения анализов.

Для оценки специфичности методики был использован коммерчески доступный лекарственный препарат Пропион® (раствор для подкожного введения, 60 мг/мл (Amgen Manufacturing Limited, Нидерланды), имеющий в своем составе

моноклональное человеческое антитело деносумаб подкласса IgG2, близкое по структуре к GNR-051, но специфичное к другому антигену² [6].

Методы

Метод биослойной интерферометрии. Метод определения концентрации GNR-051 основан на непосредственном интерферометрическом измерении в реальном времени кинетики специфического взаимодействия антигена PD-1, иммобилизованного на биосенсоре, с антителом GNR-051 в исследуемом образце сыворотки крови яванского макака. Испытания выполняли с использованием интерферометра Octet® QKe (ForteBio, США), определяли дозозависимую скорость увеличения специфического биослоя (нм) на рабочей поверхности сенсора. Используемый антиген содержит внеклеточный домен PD-1 человека, а GNR-051, обладая специфичностью только к PD-1, не связывается с другими белками сыворотки крови. В составе антигена также имеется С-концевая последовательность, аналогичная Fc-фрагменту IgG человека и обеспечивающая его обратимую иммобилизацию на поверхности биосенсоров, содержащих белок А. Все модельные и градуировочные образцы готовили на основе пулированной, неразведенной сыворотки крови яванского макака, содержащей антитело, специфичное к рецептору PD-1, в известных концентрациях.

На первом этапе биосенсоры инкубировали в растворе антигена, контролируя в режиме реального времени уровень его связывания с биосенсорами до уровня 2,5 нм. После насыщения биосенсоры инкубировали с модельными образцами и градуировочными растворами. Измерения для каждого градуировочного раствора осуществляли в двух повторностях. В ходе инкубации для каждого образца в реальном времени регистрировали скорость образования на рабочей поверхности биосенсора комплексов антиген–антитело как увеличение регистрируемого биослоя.

По результатам анализа градуировочных растворов (рис. 1) определяли зависимость начальной скорости образования комплексов (Y) от концентрации GNR-051 (X), выраженную нелинейной 4-параметрической логистической функцией вида по формуле (1):

$$Y = \frac{A + (Y_0 - A)(1 + 10^{(\lg EC_{50} - \lg X_0)P})}{1 + 10^{(\lg EC_{50} - \lg X_0)P}}, \quad (1)$$

где A — нижняя асимптота, Y_0 — усредненный минимальный сигнал, $\lg X_0$ — десятичный логарифм концентрации GNR-051, соответствующей значению Y_0 , $\lg EC_{50}$ — десятичный логарифм концентрации GNR-051, соответствующей 50% от максимального сигнала, P — угловой коэффициент 4-параметрической логистической функции.

На основании градуировочной функции (рис. 2) вычисляли концентрацию GNR-051 в модельных образцах. Все расчеты выполняли в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения Octet® Software, v. 10.0 (ForteBio, США).

² Denosumab. DrugBank Online. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06643>

³ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85. Приложение № 6. Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов.

⁴ Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85. Приложение № 6. Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов.

Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2). EMA; 2011.

Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services. CDER/FDA, CVM/FDA; 2018.

⁵ Универсальная мера зависимости, численно равная доле дисперсии зависимой переменной, которая объясняется рассматриваемой моделью зависимости.

Приготовление модельных и градуировочных растворов.

Семь градуировочных растворов готовили путем внесения GNR-051 в неразведенную пулированную сыворотку крови яванского макака до конечной концентрации GNR-051 1000, 333,3, 111,1, 37,0, 12,4, 4,1, 1,4 мкг/мл. Непосредственно перед анализом растворы разбавляли в 10 раз фосфатно-солевым буферным раствором (pH 7,4).

Для оценки правильности разрабатываемой методики готовили одиннадцать модельных образцов путем внесения GNR-051 (от 2 до 2500 мкг/мл) в неразведенную пулированную сыворотку крови яванского макака. Образец GNR-051 с концентрацией 2500 мкг/мл испытывали в разведениях 1:20 и 1:40, остальные образцы — в разведениях 1:10 и 1:20.

Результаты и обсуждение

Разработанная нами методика основана на специфическом взаимодействии иммобилизованного антигена и терапевтического антитела в образце сыворотки крови яванского макака. В качестве антигена использован внеклеточный домен рецептора PD-1, ковалентно связанный с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека, что затрудняло применение классического сэндвич-ИФА, в котором для детекции используются вторичные антитела, специфичные к Fc-фрагменту терапевтического антитела. В связи с этим для детекции был использован подход на основе биослойной интерферометрии, который позволяет непосредственно регистрировать кинетику образования комплекса антитела с антигеном и не требует использования вторичных антител или внесения дополнительных меток на исследуемые белки.

Процедура валидации методики определения концентрации GNR-051 в сыворотке крови яванского макака на основе биослойной интерферометрии соответствовала требованиям и рекомендациям нормативных документов Евразийского экономического союза³, а также международных регуляторных органов (EMA, FDA)⁴, относящихся к валидации биоаналитических методов связывания лиганда (ligand-binding assay). На основании тех же требований устанавливались критерии приемлемости для валидационных характеристик: устойчивости параметров градуировочной кривой, аналитического диапазона, правильности и прецизионности между опытами и внутри опыта, линейности разведений, специфичности и селективности.

Оценку устойчивости параметров градуировочной кривой (calibration curve reliability) проводили в 6 независимых опытах (№ 1–6) с использованием 7 градуировочных растворов (раздел «Материалы и методы»), каждый из которых анализировали в двух повторностях. В каждом опыте для градуировочной функции оценивали автоматически вычисленный с помощью программного обеспечения (Octet® Software, v. 10.0) коэффициент детерминации⁵ (R^2 , должен быть не менее 0,99). Для каждого измерения градуировочных растворов проводили обратный расчет концентрации с использованием градуировочной функции, после чего вычисляли коэффициент выявления (%R) как процентное отношение установленного значения

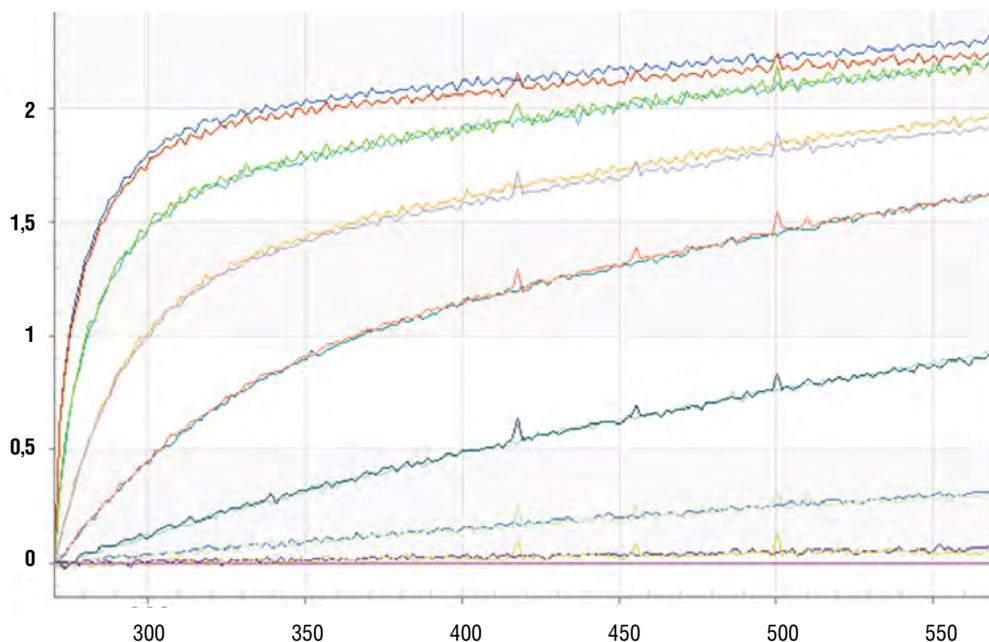


Рис. 1. Сенсограммы градуировочных растворов. По оси абсцисс — время, с; по оси ординат — толщина биосля, сформированного комплексом антиген–антитело на поверхности сенсора, нм.

Fig. 1. Sensorgrams of calibration solutions. X-axis—time, s; Y-axis—thickness of the biolayer formed by the antigen-antibody complex on the biosensor surface, nm.

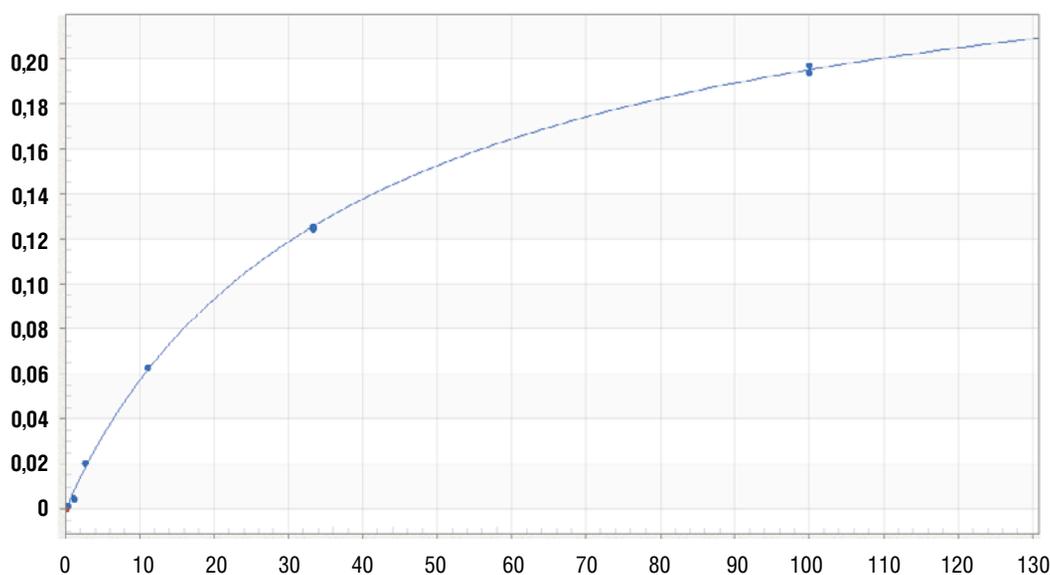


Рис. 2. График градуировочной функции. По оси абсцисс — концентрация GNR-051 в 10% пулированной сыворотке крови, мкг/мл; по оси ординат — начальная скорость формирования комплекса антиген–антитело, нм/с.

Fig. 2. Calibration function curve. X-axis—GNR-051 concentration in 10% pooled serum, µg/mL; Y-axis—initial antigen-to-antibody binding rate, nm/s.

концентрации GNR-051 («найден») к реальному значению для данного раствора («введено»), а также коэффициент вариации (%CV) между повторностями каждого градуировочного раствора как отношение стандартного отклонения к среднему значению установленной концентрации.

Для значений %R заданы следующие критерии приемлемости: для градуировочных растворов с крайними значениями концентрации (после разведения в 10 раз 0,14 и 100 мкг/мл) — 75–125%, для остальных градуировочных растворов — 80–120%. Значение %CV между повторностями каждого градуи-

ровочного раствора должно составлять менее 20%. В каждом опыте установленные критерии должны соблюдаться, по меньшей мере, для 12 из 14 измерений (75% измерений).

Во всех опытах получены удовлетворительные результаты, что позволяет считать параметры градуировочной функции устойчивыми (табл. 1, 2). Градуировочная функция, полученная в опыте № 3 и обладающая наилучшими характеристиками (наибольшее значение R^2 и соответствие %R и %CV установленным критериям для всех 14 измерений), была использована при обработке результатов во всех последующих опытах.

Таблица 1. Результаты оценки устойчивости параметров градуировочной функции в процессе валидации методики определения концентрации антитела, специфичного к рецептору PD-1 человека

Table 1. Assessment of calibration curve reliability performed during validation of the test method for determination of antibodies specific for human PD-1 receptor

Параметры градуировочной функции Calibration function parameters	Значения параметров в опыте №... Values obtained in run No....					
	1	2	3	4	5	6
R^2	0,9977	0,9995	0,9999	0,9998	0,9998	0,9966
$\lg X_0$	-0,8626	-0,8626	-0,8626	-0,8626	-0,8626	-0,8626
Y_0	0,0070	0,0070	0,0071	0,0069	0,0072	0,0067
A	0,0063	0,0062	0,0064	0,0062	0,0068	0,0058
$\lg EC_{50}$	1,6521	1,7037	1,6846	1,7038	1,4717	1,7705
P	1,0827	1,0626	1,0547	1,0723	0,8236	1,0221

Примечание. R^2 — коэффициент детерминации; $\lg X_0$ — логарифм концентрации GNR-051, соответствующей значению Y_0 ; Y_0 — усредненный минимальный сигнал; A — нижняя асимптота; $\lg EC_{50}$ — логарифм концентрации GNR-051, соответствующей 50% от максимального сигнала; P — угловой коэффициент (соответствует тангенсу угла наклона графика функции в точке, соответствующей 50% от максимального сигнала).
Note. R^2 —determination coefficient; $\lg X_0$ —logarithm of GNR-051 concentration corresponding to Y_0 value; Y_0 —averaged minimal signal; A —lower asymptote; $\lg EC_{50}$ —logarithm of GNR-051 concentration corresponding to 50% of the maximum signal; P —slope coefficient (equal to the slope of the curve at the point corresponding to 50% of the maximum signal).

Таблица 2. Результаты статистического анализа обратного расчета концентраций антитела GNR-051 в процессе валидации методики определения концентрации антитела, специфичного к рецептору PD-1 человека

Table 2. Statistical analysis of back-calculation of GNR-051 concentration performed during validation of the test method for determination of antibodies specific for human PD-1 receptor

Калибровочный раствор Calibration solution	Интервал %R в опыте №... %R range in run No...					
	1	2	3	4	5	6
С концентрацией 0,14 и 100 мкг/мл Concentrations of 0.14 and 100 µg/mL	92,5–108,2	94,9–105,1	97,5–102,9	94,6–105,4	96,4–103,6	96,4–103,6
С концентрацией 0,41–33,3 мкг/мл Concentrations of 0.41–33.3 µg/mL	82,4–115,0	<i>91,9–127,7</i>	88,0–119,7	83,2–104,4	80,7–106,2	<i>83,8–122,9</i>
Интервал %CV %CV range						
С концентрацией 0,14 и 100 мкг/мл Concentrations of 0.14 and 100 µg/mL	7,7–9,4	3,0–9,6	2,2–3,7	1,4–7,0	0,7–4,9	1,0–9,5
С концентрацией 0,41–33,3 мкг/мл Concentrations of 0.41–33.3 µg/mL	0,0–3,2	0,6–3,4	0,5–4,0	0,0–12,9	0,0–5,7	0,9–5,2
Сколько измерений соответствуют критериям? The number of measurements that meet the criteria	14/14	12/14	14/14	14/14	14/14	12/14

Примечание. %R — коэффициент выявления, %CV — коэффициент вариации. Курсивом выделены значения, не попадающие в критерии приемлемости.

Note. %R—recovery coefficient; %CV—coefficient of variation. Values that do not fall within the acceptance criteria are italicized.

Оценку правильности между опытами (between-run accuracy) выполняли в 6 независимых опытах (№ 7–12) с использованием 11 модельных образцов (раздел «Материалы и методы»), каждый из которых испытывали в двух разведениях, по два измерения на каждое разведение. Для каждого образца вычисляли коэффициент выявления (%R) как выраженное в процентах отношение усредненного экспериментально установленного значения концентрации GNR-051 («найден») к истинному значению для данного раствора («введено») и оценивали его соответствие установленным критериям приемлемости: для образцов с концентрацией GNR-051 2500 и 2 мкг/мл — 75–125%, для остальных образцов — 80–120%. Для всех образцов результаты удовлетворяли установленным критериям, что позволяет считать правильность методики подтвержденной (табл. 3).

Оценку прецизионности между опытами (between-run precision) проводили в опытах № 7–12. Для каждого модельного образца с внесением GNR-051 в концентрациях от 2 до 2500 мкг/мл по результатам 6 опытов вычисляли коэффициент вариации (%CV) между опытами как отношение стандартного отклонения к среднему значению установленной концентрации GNR-051.

По результатам проведенных опытов значения %CV удовлетворяли установленным критериям (для модельных образцов с крайними значениями концентрации — менее 25%, для остальных — менее 20%), что позволяет считать прецизионность между опытами приемлемой (табл. 3).

Оценку линейности разведения (dilution linearity) проводили в опытах № 7–12, так как при использовании методики предполагается разведение испытуемых образцов в 10, 20 и 40 раз. Модельный образец с внесением GNR-051 в концентрации до 2500 мкг/мл испытывали в разведениях в 20 и 40 раз, что соответствует 5 и 2,5% сыворотке крови яванского макака. Остальные образцы испытывали в разведениях в 10 и 20 раз, что соответствует 10 и 5% сыворотке. В каждом опыте для каждого разведения отдельно вычисляли установленную концентрацию с учетом кратности разведения, усредненную по двум измерениям. Для каждого образца вычисляли среднее по двум разведениям значение установленной концентрации GNR-051, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV) между разведениями.

Полученные результаты удовлетворяли установленным критериям для %CV между разведениями (для образцов GNR-

Таблица 3. Результаты оценки правильности и прецизионности между опытами в процессе валидации методики определения концентрации антитела, специфичного к рецептору PD-1 человека
Table 3. Results of between-run accuracy and precision assessment obtained during validation of the test method for determination of antibodies specific for human PD-1 receptor

Концентрация внесенного GNR-051, мкг/мл Concentration of GNR-051 used as a spike, µg/mL	Номер опыта Run	Установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл Measured GNR-051 concentration, µg/mL	Среднее значение установленной концентрации по опытам, мкг/мл Mean GNR-051 concentration for the runs, µg/mL	%R	SD	%CV
2500	7	2142,2	2203,3	88,1	87,5	4,0
	8	2245,8				
	9	2319,5				
	10	2251,6				
	11	2179,3				
	12	2075,6				
1000	7	1004,5	1008,6	100,9	13,5	1,3
	8	1001,7				
	9	988,7				
	10	1017,4				
	11	1011,8				
	12	1027,5				
500	7	520,0	520,9	104,2	11,5	2,2
	8	513,7				
	9	542,3				
	10	508,5				
	11	521,0				
	12	519,9				
250	7	251,9	260,7	104,3	6,2	2,4
	8	256,7				
	9	268,9				
	10	258				
	11	264,5				
	12	264,1				
125	7	125,7	128,7	103,0	1,8	1,4
	8	128,5				
	9	130,3				
	10	129,7				
	11	127,6				
	12	130,2				
62,5	7	62,2	62,5	100,0	1,9	3,0
	8	62,0				
	9	63,6				
	10	62,3				
	11	65,3				
	12	59,6				
31,3	7	30,9	30,6	97,8	1,7	5,6
	8	30,4				
	9	32,1				
	10	30				
	11	32,5				
	12	27,7				

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

Концентрация внесенного GNR-051, мкг/мл Concentration of GNR-051 used as a spike, µg/mL	Номер опыта Run	Установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл Measured GNR-051 concentration, µg/mL	Среднее значение установленной концентрации по опытам, мкг/мл Mean GNR-051 concentration for the runs, µg/mL	%R	SD	%CV
15,6	7	14	13,8	88,5	1,1	7,8
	8	13,4				
	9	14,1				
	10	13,3				
	11	15,6				
	12	12,4				
7,8	7	6,6	6,6	84,6	0,6	8,8
	8	6,3				
	9	6,5				
	10	6,3				
	11	7,8				
	12	6,3				
3,9	7	3,1	3,3	84,6	0,3	8,8
	8	3,9				
	9	3,2				
	10	3,2				
	11	3,2				
	12	3,3				
2,0	7	2,2	1,9	95,0	0,2	13,0
	8	2,1				
	9	2,0				
	10	1,9				
	11	1,8				
	12	1,5				

Примечание. %R — коэффициент выявления, SD — стандартное отклонение, %CV — коэффициент вариации.
Note. %R—recovery coefficient, SD—standard deviation, %CV—coefficient of variation.

051 с крайними значениями концентрации — менее 25%, для остальных — менее 20%), что позволяет считать линейность разведения приемлемой при разведении образцов в 10–40 раз (табл. 4).

Оценку правильности и прецизионности внутри опыта (*within-run accuracy and precision*) проводили в опыте № 13. Готовили 7 модельных образцов с внесением GNR-051 в концентрации от 7,8 до 500 мкг/мл по той же схеме, что и в опытах № 7–12, однако каждый образец испытывали в 4 независимых повторностях. Каждая повторность включала анализ в двух разведениях (в 10 и 20 раз), по 2 измерения на каждое разведение. В каждой повторности результат усредняли по разведениям и измерениям. Для каждого образца GNR-051 вычисляли среднее по повторностям значение концентрации, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV) между повторностями, а также коэффициент выявления (%R). Результаты удовлетворяли установленным критериям для %CV между повторностями (должен быть менее 20%) и для %R (не должен выходить за пределы 80–120%), что позволяет считать правильность и прецизионность внутри опыта приемлемыми (табл. 5).

Специфичность (*specificity*) методики как способность аналитической методики различать аналит и родственные ему соединения исследовали в опыте № 14. Для этого готовили и ис-

пытывали модельные образцы с внесением препарата Пролиа® до концентрации 62,5–500 мкг/мл, аналогично образцам из опытов № 7–12. Этот препарат содержит полностью человеческое моноклональное антитело деносуаба, схожее по структуре с GNR-051, но отличающееся по биологической активности и специфическим участкам аминокислотной последовательности⁶ [6].

В результате анализа во всех образцах, независимо от концентрации деносуаба, получили значение концентрации GNR-051 ниже предела обнаружения (данные не представлены). Результаты, полученные в опыте № 14, а именно — отсутствие значимого сигнала (достоверно превышающего фоновое значение) в образцах, содержащих вещество, структурно родственное GNR-051, свидетельствует о специфичности валидируемой методики.

Селективность (*selectivity*) методики как способность определять аналит с достаточной точностью в присутствии компонентов матрицы биологического образца оценивали в опыте № 15. Для этого готовили и испытывали модельные образцы на основе индивидуальной сыворотки крови яванского макака, взятые от 10 здоровых животных (№ 1–10 — источник биологической матрицы, табл. 6), к каждому из которых добавляли GNR-051 в концентрациях 15,6 и 125 мкг/мл. Для каждого уровня концентрации «внесенного» GNR-051 вычисляли среднее

⁶ Denosumab. DrugBank Online. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06643>

Таблица 4. Результаты оценки линейности разведений в процессе валидации методики определения концентрации антитела, специфичного к рецептору PD-1 человека

Table 4. Results of dilution linearity assessment obtained during validation of the test method for determination of antibodies specific for human PD-1 receptor

Концентрация внесенного GNR-051, мкг/мл Concentration of GNR-051 used as a spike, µg/mL	Номер опыта Run	Установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл при разведении... GNR-051 concentration, µg/mL, at dilution...			Среднее по разведениям установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл Mean GNR-051 concentration for the dilutions, µg/mL	SD	%CV
		1:10	1:20	1:40			
2500	7	–	2137,0	2147,4	2142,2	7,35	0,3
	8	–	2151,0	2340,7	2245,8	63,14	6,3
	9	–	2294,1	2344,6	2319,5	35,57	1,5
	10	–	2076,5	2426,7	2251,6	247,63	11,0
	11	–	2129,8	2228,8	2179,3	70,00	3,2
	12	–	2130,0	2021,3	2075,6	76,86	3,7
1000	7	981,5	1027,4	–	1004,5	32,46	3,2
	8	957,1	1046,4	–	1001,7	63,14	6,3
	9	1018,5	959,0	–	988,7	42,07	4,3
	10	979,4	1055,5	–	1017,4	53,81	5,3
	11	999,9	1023,7	–	1011,8	16,83	1,7
	12	1054,5	1000,6	–	519,9	21,64	4,2
500	7	514,6	525,4	–	520,0	7,64	1,5
	8	490,8	536,7	–	513,7	32,46	6,3
	9	533,4	551,1	–	542,3	12,52	2,3
	10	477,8	539,3	–	508,5	43,49	8,6
	11	521,6	520,5	–	521,0	0,78	0,1
	12	504,6	535,2	–	519,9	21,64	4,2
250	7	241,9	262,0	–	251,9	14,21	5,6
	8	245,8	267,5	–	256,7	15,34	6,0
	9	268,6	269,2	–	268,9	0,42	0,2
	10	251,8	264,2	–	258,0	8,77	3,4
	11	266,5	262,4	–	264,5	2,90	1,1
	12	256,6	271,7	–	264,1	10,68	4,0
125	7	124,5	127,0	–	127,7	1,77	1,4
	8	127,6	129,4	–	128,5	1,27	1,0
	9	130,0	130,7	–	130,3	0,49	0,4
	10	130,3	128,7	–	129,7	1,41	1,1
	11	126,0	129,3	–	127,6	2,33	1,8
	12	133,4	127,0	–	130,2	4,53	3,5
62,5	7	63,4	60,9	–	62,2	1,77	2,8
	8	64,5	59,5	–	62,0	3,54	5,7
	9	65,6	61,7	–	63,6	2,76	4,3
	10	64,9	59,8	–	62,3	3,61	5,8
	11	65,0	65,7	–	65,3	0,49	0,8
	12	63,7	55,5	–	59,6	5,80	9,7
31,3	7	30,9	31,0	–	30,9	0,07	0,2
	8	30,8	30,0	–	30,4	0,57	1,9
	9	31,2	32,9	–	32,1	1,20	3,7
	10	30,4	29,7	–	30,0	0,49	1,6
	11	32,9	32,2	–	32,5	0,49	1,5
	12	28,4	27,0	–	27,7	0,99	3,6
15,6	7	14,9	13,2	–	14	1,20	8,6
	8	14,2	12,5	–	13,4	1,20	9,0
	9	15,2	12,9	–	14,1	1,63	11,5
	10	14,2	12,4	–	13,3	1,27	9,6
	11	15,5	15,8	–	15,6	0,21	1,4
	12	13,1	11,6	–	12,4	1,06	8,6

Продолжение таблицы 4
Table 4 (continued)

Концентрация внесенного GNR-051, мкг/мл Concentration of GNR-051 used as a spike, µg/mL	Номер опыта Run	Установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл при разведении... GNR-051 concentration, µg/mL, at dilution...			Среднее по разведениям установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл Mean GNR-051 concentration for the dilutions, µg/mL	SD	%CV
		1:10	1:20	1:40			
7,8	7	6,5	6,8	–	6,6	0,21	3,2
	8	6,2	6,4	–	6,3	0,14	2,2
	9	6,5	6,5	–	6,5	0,00	0,0
	10	6,1	6,5	–	6,3	0,28	4,5
	11	7,9	7,7	–	7,8	0,14	1,8
	12	6,1	6,5	–	6,3	0,28	4,5
3,9	7	3	3,2	–	3,1	0,14	4,6
	8	3,9	3,8	–	3,9	0,07	1,8
	9	3,1	3,3	–	3,2	0,14	4,4
	10	3,2	3,3	–	3,2	0,07	2,2
	11	3,1	3,2	–	3,2	0,07	2,2
	12	3,2	3,4	–	3,3	0,14	4,3
2,0	7	1,9	2,4	–	2,2	0,35	16,1
	8	2,0	2,1	–	2,1	0,07	3,4
	9	2,1	2,0	–	2,0	0,07	3,5
	10	2,0	1,9	–	1,9	0,07	3,7
	11	1,9	1,8	–	1,8	0,07	3,9
	12	1,7	1,4	–	1,5	0,21	14,1

Примечание. SD — стандартное отклонение, %CV — коэффициент вариации.

«–» измерение не было проведено.

Note. SD—standard deviation, %CV—coefficient of variation.

– not measured.

Таблица 5. Результаты оценки правильности и прецизионности внутри опыта в процессе валидации методики определения концентрации антитела, специфичного к рецептору PD-1 человека

Table 5. Results of within-run accuracy and precision assessment obtained during validation of the test method for determination of antibodies specific for human PD-1 receptor

Концентрация внесенного GNR-051, мкг/мл Concentration of GNR-051 used as a spike, µg/mL	Установленное значение концентрации GNR-051 в повторности, мкг/мл GNR-051 concentration, µg/mL, measured in replicate				Среднее по повторностям установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл Mean GNR-051 concentration for the replicates, µg/mL	%CV	%R
	1	2	3	4			
500	487,9	513,6	510,4	480,6	498,1	3,3	99,6
250	242,1	240,8	249,5	241,3	243,4	1,7	97,4
125	118,3	119,9	123,6	123,6	121,4	2,2	97,1
62,5	57,2	58,2	60,6	62,6	59,7	4,1	95,4
31,3	27,3	29,2	29,8	30,7	29,3	4,9	93,5
15,6	14,2	13,4	13,9	14,9	14,1	4,4	90,4
7,8	6,19	6,16	6,83	6,94	6,5	6,3	83,7

Примечание. %CV — коэффициент вариации, %R — коэффициент выявления.

Note. %CV—coefficient of variation, %R—recovery coefficient.

«найденное» значение по образцам, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV) между образцами; для каждого образца вычисляли коэффициент выявления (%R).

Полученные результаты соответствуют установленным критериям (%CV между образцами для каждого уровня концентрации должен быть менее 25%, %R должен находиться в диапазоне 75–125% не менее чем для 8 образцов на каждом уровне концентрации), что позволяет считать методику селективной, а эффект матрицы — приемлемым (табл. 6).

Заключение

Проведенная валидация методики определения концентрации антитела человека, блокирующего связывание PD-1

с лигандами в сыворотке крови яванского макака, методом биослойной интерферометрии, включающая оценку ключевых валидационных характеристик, подтверждает ее пригодность для получения достоверных и воспроизводимых результатов определения концентрации GNR-051 в диапазоне 2–2500 мкг/мл.

Подтверждена устойчивость параметров градуировочной кривой (во всех опытах R^2 не ниже 0,996; при обратном расчете концентрации %R находился в допустимом интервале 80–125% для 12 или более измерений из 14; %CV не превысил 12,9%).

Подтверждены правильность и прецизионность между опытами (%R в диапазоне 84,6–104,3%, %CV не превысил 13,0%) и внутри опыта (%R в диапазоне 83,7–99,6%, %CV не превысил 6,3%).

Таблица 6. Результаты оценки селективности методики определения концентрации антитела, специфичного к рецептору PD-1 человека

Table 6. The results of evaluating the selectivity of the test method for determination of antibodies specific for human PD-1 receptor

Источник биологической матрицы Source of biological matrix	Модельный образец с внесенной концентрацией GNR-051 15,6 мкг/мл Model sample spiked with 15.6 µg/mL GNR-051		Модельный образец с внесенной концентрацией GNR-051 125 мкг/мл Model sample spiked with 125 µg/mL GNR-051	
	установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл measured GNR-051 concentration, µg/mL	%R	установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл measured GNR-051 concentration, µg/mL	%R
1	15,9	101,9	130,6	104,5
2	16,4	105,1	128,2	102,6
3	16,9	108,3	128,6	102,9
4	16,0	102,6	132,7	106,2
5	16,1	103,2	133,5	106,8
6	16,3	104,5	133,0	106,4
7	16,6	106,4	135,8	108,6
8	15,8	101,3	132,4	105,9
9	15,6	100,0	133,1	106,5
10	16,5	105,8	126,5	101,2
Среднее установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл Mean GNR-051 concentration, µg/mL	16,2	103,9	131,4	105,2
SD	0,40	—	2,88	—
%CV	2,48	—	2,19	—

Примечание. %R — коэффициент выявления, SD — стандартное отклонение, %CV — коэффициент вариации. «—» неприменимо.

Note. %R—recovery coefficient, SD—standard deviation, %CV—coefficient of variation. — not applicable.

Линейность разведений была показана во всем диапазоне использованных концентраций (%CV между разведениями не превысил 16,1%).

Показана специфичность (в отношении структурно-родственного антитела с другой специфичностью) и селективность разработанной методики в отношении компонентов матрицы биологических образцов (%CV между индивидуальными матрицами не превышало 2,5%).

Вклад авторов. **К. В. Ульянова** — выполнение экспериментальных работ (приготовление модельных и градуировочных образцов и растворов, проведение интерферометрических измерений), интерпретация результатов исследования (оценка правильности, прецизионности, линейности разведения, специфичности и селективности), подготовка рукописи; **А. А. Казаров** — статистическая обработка данных (оценка устойчивости параметров градуировочной кривой, вычисление значений среднего арифметического, коэффициента выявления, стандартного отклонения и коэффициента вариации на всех этапах валидации метода), доработка рукописи; **М. С. Пантюшенко** — выполнение экспериментальных работ (приготовление модельных и градуировочных образцов и растворов, проведение интерферометрических измерений), доработка рукописи; **А. А. Оленев** — выполнение экспериментальных работ (приготовление модельных и градуировочных образцов и растворов, проведение интерферометрических измерений), интерпретация результатов исследования (оценка правильности, прецизионности, линейности разведения, специфичности и селективности), доработка рукописи; **И. В. Лягоскин** — написание текста и критический пересмотр его содержания; **В. М. Симонов** — идея, планирование исследования, интерпретация результатов исследования (оценка устойчивости параметров градуи-

ровочной кривой, правильности, прецизионности, линейности разведения, специфичности и селективности), подготовка рукописи.

Authors' contributions. **Kseniya V. Ulyanova**—experimental work (preparation of model and calibration samples and solutions, carrying out interferometric measurements), interpretation of the study results (assessment of accuracy, precision, dilution linearity, specificity, and selectivity), writing of the paper; **Aleksandr A. Kazarov**—statistical processing of data (assessment of calibration curve reliability, calculation of mean values, recovery coefficients, standard deviations, and coefficients of variation at all stages of the method validation), revision of the paper; **Marina S. Pantyushenko**—experimental work (preparation of model and calibration samples and solutions, carrying out interferometric measurements), revision of the paper; **Aleksandr A. Olenev**—experimental work (preparation of model and calibration samples and solutions, carrying out interferometric measurements), interpretation of the study results (assessment of accuracy, precision, dilution linearity, specificity, and selectivity), revision of the paper; **Ivan V. Lyagoskin**—writing and revising of the text; **Vladimir M. Simonov**—elaboration of the study idea, planning the study, interpretation of the study results (assessment of calibration curve reliability, accuracy, precision, dilution linearity, specificity, and selectivity), writing of the paper.

Благодарности. Авторы выражают благодарность коллективу ООО «МБЦ «Генериум» за предоставление материалов для проведения экспериментов.

Acknowledgements. The authors are grateful to all employees of IBC "Generium" for providing materials for the experiments.

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. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252–64. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
2. Wu Y, Chen W, Xu ZP, Gu W. PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy — blockade, knockdown, or inhibition. *Front Immunol*. 2019;10:2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02022>
3. Deng R, Bumbaca D, Pastuskovas CV, Boswell CA, West D, Cowan KJ, et al. Preclinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, tissue distribution, and tumor penetration of anti-PD-L1 monoclonal antibody, an immune checkpoint inhibitor. *MAbs*. 2016; 8(3):593–603. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1136043>
4. Xiaomo Wu, Zhongkai Gu, Yang Chen, Borui Chen, Wei Chen, Liqiang Weng, Xiaolong Liu. Application of PD-1 blockade in cancer immunotherapy. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:661–74. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.03.006>
5. Лепик КВ. Ингибиторы иммунных контрольных точек в терапии лимфом. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2018;11(4):303–12. [Lepik KV. Immune checkpoint inhibitors in the treatment of lymphomas. *Klinicheskaya onkologematologiya. Fundamental'nyye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice*. 2018;11(4):303–12 (In Russ.)]
6. Rizzoli R, Yasothan U, Kirkpatrick P. Denosumab. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(8):591–2. <https://doi.org/10.1038/nrd3244>

Об авторах / Authors

Ульянова Ксения Владимировна. *Kseniya V. Ulyanova.* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3793-7978>

Казаров Александр Александрович. *Aleksandr A. Kazarov.* ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0682-6113>

Пантюшенко Марина Семеновна, канд. биол. наук. *Marina S. Pantyushenko,* Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2766-2560>

Оленев Александр Андреевич. *Aleksandr A. Olenev.* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2926-0952>

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

Симонов Владимир Михайлович. *Vladimir M. Simonov.* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0879-5595>

Поступила 18.08.2020

После доработки 16.10.2020

Принята к публикации 04.12.2020

Received 18 August 2020

Revised 16 October 2020

Accepted 4 December 2020

Исследование гемостимулирующих свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека

Г. Г. Шими́на*, А. В. Батенева, С. Г. Гамалей, Т. И. Есина, Т. Г. Терещенко, Е. Д. Даниленко

Институт медицинской биотехнологии Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
ул. Химзаводская, д. 9, Бердск, Новосибирская область, 633010, Российская Федерация

Гемостимулирующие свойства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) позволяют использовать его в клинике для снижения побочных эффектов радио- и химиотерапии онкологических заболеваний, при трансплантации костного мозга, для лечения некоторых первичных иммунодефицитных состояний, связанных с лейкопенией. В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработана высокопроизводительная технология получения рекомбинантного ГМ-КСФ человека (рчГМ-КСФ) на основе рекомбинантного штамма *E. coli*. **Цель работы:** изучение гемостимулирующей активности препарата рекомбинантного ГМ-КСФ человека, полученного по разработанной технологии, в культуре клеток и на модели миелосупрессии у мышей, вызванной введением циклофосфана. **Материалы и методы:** оценку гемостимулирующей активности рчГМ-КСФ *in vitro* проводили с использованием МТТ-теста на коммерческой культуре клеток промиелоцитарной лейкемии HL-60, скорость роста которых предварительно подавляли добавлением в среду низкой концентрации диметилсульфоксида. Исследования *in vivo* проводили на мышах линии CBA/Calac в условиях миелосупрессии, вызванной введением циклофосфана. Гемостимулирующие свойства препарата оценивали при его подкожном введении в диапазоне доз от 1 до 175 мкг/кг в течение 4–5 суток после введения цитостатика. В образцах крови, взятых в разные сроки после введения, определяли общее количество лейкоцитов и содержание их морфологических форм. Данные эксперимента обрабатывали методами вариационной статистики с помощью пакета программ Statgraphics, v. 5.0. **Результаты:** пролиферативная активность клеток HL-60, инкубированных с препаратом рчГМ-КСФ в течение 72 ч, носила дозозависимый характер. Наиболее высокие значения повышения пролиферативной активности при увеличении дозы препарата наблюдались в диапазоне концентраций от 0,04 до 0,64 нг/мл (прирост значений показателя при двукратном увеличении дозы составлял 11–18%). В экспериментах на мышах продемонстрирован двухфазный характер дозовой зависимости эффекта. Наибольшую гемостимулирующую активность препарат проявлял в дозе 90 мкг/кг. **Выводы:** препарат рчГМ-КСФ, полученный по разработанной технологии, обладает выраженной гемостимулирующей активностью, подтвержденной в системах *in vitro* и *in vivo*. **Ключевые слова:** рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека (рчГМ-КСФ); гемостимулирующая активность; миелосупрессия; циклофосфан; мыши линии CBA/Calac; культура клеток HL-60

Для цитирования: Шими́на ГГ, Батенева АВ, Гамалей СГ, Есина ТИ, Терещенко ТГ, Даниленко ЕД. Исследование гемостимулирующих свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(4):268–276. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-268-276>

* **Контактное лицо:** Шими́на Галина Григорьевна; shimina_gg@vector.nsc.ru

Study on Hemostimulating Properties of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

G. G. Shimina*, A. V. Bateneva, S. G. Gamaley, T. I. Esina, T. G. Tereshchenko, E. D. Danilenko

State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”
of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing,
9 Khimzavodskaya St., Berdsk, Novosibirsk oblast 633010, Russian Federation

The hemostimulating properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) make possible its clinical use in alleviating side effects of anti-cancer radio- and chemotherapy, in bone marrow transplantation, and in the treatment of some primary immunodeficiency conditions associated with leukopenia. The State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing has developed a high-performance technology for production of recombinant human GM-CSF (rhGM-CSF) based on a recombinant *E. coli* strain. **The aim of the study** was to assess hemostimulating activity of the rhGM-CSF preparation obtained using the new developed technology, as observed in cell culture and in the mice model of myelosuppression induced by cyclophosphamide administration. **Materials and methods:** *in vitro* evaluation of rhGM-CSF hemostimulating activity was performed by MTT assay in the commercial HL-60 promyelocytic leukemia cell culture with preliminary suppression of cell growth rate by adding a low concentration of dimethyl sulfoxide to the medium. *In vivo* studies were carried out in CBA/Calac mice with

cyclophosphamide-induced myelosuppression. The hemostimulating properties of the drug were evaluated after subcutaneous administration of 1–175 µg/kg doses for 4–5 days, following administration of a cytostatic agent. The total number of leukocytes and the content of their morphological forms were determined in blood samples taken at different time points after the drug administration. The statistical processing of the experimental data was based on analysis of variance using Statgraphics v. 5.0 software. **Results:** the proliferative activity of HL-60 cells incubated with the rhGM-CSF preparation for 72 hours was shown to be dose-dependent. The highest values of the increase in proliferative activity associated with an increase in the drug dose were observed in the concentration range from 0.04 to 0.64 ng/mL (proliferative activity increased by 11–18% when the dose was increased two-fold). The experiments in mice demonstrated a two-phase pattern of the dose-dependent effect. The drug showed the highest hemostimulating effect at the dose of 90 µg/kg. **Conclusions:** the rhGM-CSF preparation obtained using the new developed technology has a pronounced hemostimulating activity confirmed by both *in vitro* and *in vivo* test systems.

Key words: recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF); hemostimulating activity; myelosuppression; cyclophosphamide; CBA/CaLac mice; HL-60 cell culture

For citation: Shimina GG, Bateneva AV, Gamaley SG, Esina TI, Tereshchenko TG, Danilenko ED. Study on hemostimulating properties of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):268–276. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-268-276>

* **Corresponding author:** Galina G. Shimina; shimina_gg@vector.nsc.ru

Как известно, нейтрофилы играют важную роль в цепи защитных реакций организма. Нейтропеническая инфекция в силу ослабления иммунной защиты склонна к быстрому прогрессированию и без лечения может в короткие сроки привести к гибели больного [1]. Профилактика нейтропении и лечение уже развившейся нейтропении и нейтропенических осложнений — основные области применения лекарственных препаратов, активным компонентом которых являются колониестимулирующие факторы [1, 2].

Среди ростовых факторов, играющих ключевую роль в процессах гранулоцитопоэза, особое место принадлежит гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору (ГМ-КСФ). ГМ-КСФ — природный белок-цитокин с плеiotропными биологическими свойствами. Гемопэтическая активность ГМ-КСФ заключается в мобилизации нейтрофилов и моноцитов из тканевых депо в системный кровоток, ускорении их пролиферации и созревания в костном мозге, а также в усилении функциональной активности фагоцитирующих клеток [2–4].

Способность ГМ-КСФ стимулировать пролиферацию и дифференцировку предшественников гранулоцитов и макрофагов сделала возможным его клиническое использование для снижения побочных эффектов радио- и химиотерапии злокачественных новообразований, мобилизации клеток-предшественников и улучшения приживления трансплантатов костного мозга, а также для лечения некоторых первичных иммунодефицитных состояний, связанных с лейкопенией [2, 5–7].

Исследования последних лет дают основания полагать, что область клинического применения данного цитокина может быть значительно расширена. Негематологические показания к применению препаратов ГМ-КСФ связаны с его альтернативными биологическими эффектами, включая иммуномодулирующие, противовоспалительные, противоопухолевые, трофические эффекты, способность стимулировать регенерацию и неоангиогенез. Это позволяет рассматривать возможность применения препарата при различных вторичных иммунодефицитах, травматических поражениях, ишемической патологии, дистрофических болезнях, репродуктивной дисфункции, аутоиммунных, аллергических и иммуновоспалительных синдромах, некоторых неоплазиях и инфекциях [2].

Одной из главных проблем в технологии получения рекомбинантного ГМ-КСФ человека (рГМ-КСФ) как фармацевтической субстанции является низкая продуктивность рекомбинантных штаммов-продуцентов [8, 9]. Для решения этой проблемы в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора была

сконструирована рекомбинантная плаزمидная р280_2GM, несущая тандем генов ГМ-КСФ человека, и штамм-продуцент на ее основе. Разработанный способ выделения и очистки рекомбинантного ГМ-КСФ из клеток штамма-продуцента обеспечивает получение до 10 мг высокоочищенного белка из 1 г влажных клеток, что в 1,5–2 раза выше, чем при использовании других бактериальных продуцентов [10].

Цель работы — изучение гемостимулирующей активности препарата рекомбинантного ГМ-КСФ человека, полученного по разработанной технологии, в культуре клеток и на модели миелосупрессии у мышей, вызванной введением циклофосфана.

Материалы и методы

В экспериментах использовали препарат рГМ-КСФ, полученный в Институте медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора [10, 11]. Содержание белка в препарате рГМ-КСФ определяли по методу Брэдфорда [12]. Для определения чистоты, гомогенности и молекулярной массы рГМ-КСФ использовали метод вертикального гель-электрофореза в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием красителем Кумасси R-250 [13]. Содержание примесных белков штамма-продуцента оценивали иммуноферментным методом, содержание примесных ДНК — методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих наборов *E. coli* HCP ELISA Kit и *E. coli* Host Cell DNA Extraction and Amplification Kit (Cygnus Technologies, США).

Оценку гемостимулирующей активности рГМ-КСФ *in vitro* проводили на коммерческой культуре клеток промиелоцитарной лейкемии человека HL-60 (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург), скорость роста которых предварительно подавляли добавлением в среду низкой концентрации диметилсульфоксида (ДМСО) [14].

Клетки HL-60 субкультивировали в ростовой среде RPMI-1640 с L-глутамином, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина. В лунки 96-луночного культурального планшета (TPP, Швейцария) вносили по 100 мкл клеточной суспензии (1×10^4 клеток) в ростовой среде, содержащей 1,25% ДМСО, инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С в атмосфере с 5% CO₂ в течение 48 ч, после чего вносили тестируемый препарат в объеме 25 мкл, который предварительно разводили в ростовой среде с 1,25% ДМСО до конечных концентраций в лунках от 0,005 до 5,12 нг/мл, с 2-кратным

шагом разведений. Каждое разведение ставили в 5 повторях. В контрольные лунки вносили по 25 мкл среды с ДМСО. Клетки культивировали (37 °С, 5% CO₂) в течение 72 ч. Оценку количества живых клеток проводили с помощью МТТ-теста [15]. Для этого в лунки вносили по 25 мкл раствора красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в концентрации 5 мг/мл, планшеты инкубировали при температуре 37 °С в течение 4 ч. После удаления среды в лунки вносили по 100 мкл ДМСО для растворения кристаллов образовавшегося формазана, встряхивали на шейкере при 600 об/мин в течение 5 мин. Оптическую плотность растворенного формазана измеряли на многоканальном планшетном спектрофотометре при длине волны 596 нм (референс-фильтр — 630 нм). На основании средних значений оптической плотности в контрольных лунках и лунках с исследуемым препаратом рассчитывали процент стимуляции роста клеток в исследованном диапазоне концентраций.

Метод изучения гемостимулирующей активности рЧГМ-КСФ на мышах и условия содержания животных были аналогичны описанному для нуклеопротеидного комплекса, выделенного из плаценты человека (Панаген) [16]. Исследования *in vivo* проведены на 132 самцах мышей линии СВА/Calac с массой тела 19–23 г (возраст 2,5–3,0 месяца), полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирская область). До начала эксперимента животные прошли период адаптационного карантина. Мыши содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении на сбалансированном пищевом рационе со свободным доступом к корму и воде. Условия содержания и ухода за животными соответствовали действующим нормативным документам¹. Работа выполнена согласно основным регулирующим стандартам в области надлежащей лабораторной практики² с соблюдением международных рекомендаций Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях³.

Манипуляции осуществляли в одно и то же время (в утренние часы). Для моделирования миелосупрессии мышам однократно вводили раствор циклофосфана (ЦФ) (Sigma-Aldrich, США) в максимально переносимой дозе (250 мг/кг) в объеме 0,25 мл на 20 г массы тела.

Было проведено две серии экспериментов. В первой серии исследовали динамику восстановления показателей крови под действием препарата рЧГМ-КСФ в стандартной дозе (100 мкг/кг), определенной ранее в предварительных экспериментах. С этой целью препарат вводили мышам опытных групп подкожно в объеме 0,2 мл на 20 г массы тела один раз в сутки в течение 4, 5 и 6 суток, первое введение — через 24 ч после инъекции ЦФ, забор крови на анализ — на 5, 6, 7 и 8-е сутки после введения ЦФ. Во второй серии экспериментов уточняли диапазон эффективных доз препарата при его введении в соответствии с выбранной схемой. Животные опытных групп получали инъекции препарата рЧГМ-КСФ в дозах от 1 до

175 мкг/кг. Во всех экспериментах мышам контрольных групп вводили подкожно физиологический раствор в эквивалентном объеме и по той же схеме, что и животным опытной группы. В каждой экспериментальной группе было по 6 мышей. После окончания курса введения препаратов у животных забирали на анализ образцы крови из кончика хвоста. В образцах крови определяли общее количество лейкоцитов, относительное и абсолютное содержание нейтрофилов и других морфологических форм лейкоцитов [17].

Данные экспериментов обрабатывали методами вариационной статистики с помощью пакета программ Statgraphics, v. 5.0 (Statistical Graphics Corp., США). Рассчитывали групповые показатели суммарной статистики — среднюю арифметическую величину и стандартную ошибку ($M \pm m$). В связи с малыми объемами выборок для оценки значимости межгрупповых различий применяли непараметрический *H*-критерий Краскала — Уоллиса. При обнаружении статистически значимых различий проводили сравнения с помощью двухвыборочного *U*-критерия Манна — Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (*p*) принимали равным 0,05 [18].

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования был проведен анализ чистоты образца рЧГМ-КСФ. Установлено, что концентрация белка в препарате составляла 1,17 мг/мл, гомогенность — 95,3%, молекулярная масса белковой фракции — 15,7 кДа. Содержало примесей ДНК клеток штамма-продуцента не превышало 8,55 пг/мг, примесных белков — 65,17 нг/мг. То есть препарат содержал высокоочищенный белок, соответствующий требованиям, предъявляемым к рекомбинантным белкам фармацевтического качества⁴.

Вторым этапом исследования являлась оценка гемостимулирующей активности рЧГМ-КСФ на клетках промиелоцитарной лейкемии HL-60. Показано, что препарат вызывал усиление роста культуры клеток в диапазоне доз 0,005–5,12 нг/мл (табл. 1). Динамика роста клеток носила дозозависимый характер. Наиболее высокие значения повышения пролиферативной активности при увеличении дозы наблюдались в диапазоне концентраций от 0,04 до 0,64 нг/мл (прирост значений показателя при двукратном увеличении дозы составлял 11–18%). При использовании более высоких доз наблюдалось замедление процесса, что, возможно, связано с ограниченным количеством мест рецепторного связывания белка и достижением определенного предела насыщения. Концентрация рЧГМ-КСФ, вызывающая 50% увеличение количества клеток, составляла 0,043 нг/мл.

Метод определения биологической активности гемостимулирующих факторов с использованием клеточной линии HL-60 был предложен Т. Yamaguchi с соавт. [14]. В данной работе было продемонстрировано дозозависимое усиление клеточной пролиферации под влиянием рЧГМ-КСФ, полученного

¹ СП 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г. № 51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур (Переиздание).

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

² Правила надлежащей лабораторной практики (утв. Приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199н).

ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики.

³ European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

⁴ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0007.15 Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Таблица 1. Стимуляция роста клеток HL-60 в зависимости от концентрации рчГМ-КСФ через 72 ч инкубации
Table 1. Stimulation of HL-60 cell growth as a function of rhGM-CSF concentration after 72 hours of incubation

Концентрация рчГМ-КСФ, нг/мл Concentration of rhGM-CSF, ng/mL	Пролиферативная активность ($M \pm m$), % Proliferative activity ($M \pm m$), %
0,005	16,8 ± 1,1
0,01	22,2 ± 2,8
0,02	31,4 ± 1,9
0,04	48,6 ± 2,0
0,08	66,4 ± 1,2
0,16	75,4 ± 2,2
0,32	93,6 ± 4,5
0,64	111 ± 3
1,28	117 ± 5
2,56	115 ± 3
5,12	122 ± 2

Примечание. Пролиферативная активность выражена в процентах к контрольной группе — клеточная суспензия без добавления рчГМ-КСФ.
 $M \pm m$ — средняя арифметическая величина и стандартная ошибка.
Note. Proliferative activity is expressed as a percentage as compared to the control group—a cell suspension with no addition of rhGM-CSF.
 $M \pm m$ —the mean value and standard deviation.

в прокариотической системе (*E. coli*) в диапазоне концентраций 0,1–1,75 нг/мл, что согласуется с результатами нашего исследования.

В исследовании А. А. Гражданцевой с соавт. [19] биологическая активность рчГМ-КСФ, синтезируемого эукариотическими клетками ЛЭЧ-240 и ВНК-Ф, инфицированными рекомбинантным штаммом вируса осповакцины со встроенным геном ГМ-КСФ человека, была протестирована на клетках эритролейкоза человека TF-1. Авторы работы обнаружили зависимость от дозы стимуляции пролиферации клеток TF-1 при добавлении культуральной среды клеток-продуцентов рчГМ-КСФ. Биологическая активность образцов зависела от типа клеток-продуцентов ГМ-КСФ. Так, концентрация белка, вызывающая двукратное увеличение количества клеток TF-1, для белка, продуцируемого клетками ЛЭЧ-240, составляла 1,2 мкг/мл, клетками ВНК-Ф — 40 мкг/мл, что в основном соответствует диапазону эффективных концентраций рчГМ-КСФ в наших экспериментах.

Таким образом, препарат рчГМ-КСФ, полученный по разработанной технологии, обладал способностью усиливать пролиферативную активность клеток промиелоцитарной лейкемии HL-60, чувствительных к природному ГМ-КСФ.

Следующим этапом работы было изучение активности препарата рчГМ-КСФ *in vivo*. На рисунке 1 приведены экспериментальные данные, полученные в процессе цитостатической миелосупрессии, вызванной введением ЦФ мышам. Установлено, что введение цитостатика приводило к резкому снижению в крови животных общего числа лейкоцитов и сегментоядерных нейтрофилов. Содержание лейкоцитов крови мышей контрольной и опытной групп на 5-е сутки после введения ЦФ было ниже интактных значений, соответственно, на 87 и 84%, нейтрофилов — на 92 и 88%. На 6-е сутки эксперимента в группе, которой вводили рчГМ-КСФ (100 мкг/кг), отмечено статистически значимое повышение значений показателей по сравнению с контролем: лейкоцитов — в 1,3 раза, сегментоядерных нейтрофилов — в 1,5 раза. На 7-е и 8-е сутки уровень показателей в обеих группах уже не отличался от интактного, поэтому дальнейшее исследование активности препарата проводилось на 5-е и 6-е сутки после введения ЦФ.

Животные опытных групп второй экспериментальной серии получали инъекции препарата рчГМ-КСФ в дозах от 1 до 175 мкг/кг четырехкратно, инъекции начинали через 1 сутки

после введения ЦФ, кровь на анализ забирали на 5-е и 6-е сутки после введения цитостатика.

Результаты, полученные в эксперименте по исследованию активности препарата в диапазоне доз 50–175 мкг/кг, представлены на рисунке 2. В группе мышей, которым вводили препарат рчГМ-КСФ в дозе 75 мкг/кг, отмечена отчетливая тенденция к ускорению восстановления морфологического состава периферической крови по сравнению с группой контрольной и группой животных, которым препарат вводили в дозе 50 мкг/кг. Через 1 сутки после окончания введения препарата (5-е сутки после введения ЦФ) количество лейкоцитов крови мышей, получавших препарат в дозе 75 мкг/кг, было в 1,3 раза выше, сегментоядерных нейтрофилов — в 1,25 раза выше контрольных показателей. Дальнейшее увеличение дозы до 125–175 мкг/кг приводило к торможению процесса. В крови животных этих групп отмечена тенденция к снижению содержания лейкоцитов и нейтрофилов по сравнению с контрольным уровнем, достоверная по содержанию нейтрофилов в группе мышей, которым препарат вводили в дозе 150 мкг/кг (рис. 2).

Как известно, двухфазная кривая «доза–эффект» является универсальным свойством биологических систем [20]. Анализ данных литературы свидетельствует о том, что ГМ-КСФ может оказывать иммуностимулирующее действие в малых дозах и иммуносупрессивное — в высоких [21]. Оппозитные эффекты ГМ-КСФ в разных дозах на кроветворные клетки-предшественники описаны L. Sun с соавт. [22]. Авторами этой работы показано, что низкие дозы ГМ-КСФ способствовали увеличению числа клеток гранулоцитарной линии преимущественно путем повышения их выживаемости; увеличение дозы приводило к выходу на плато с последующим снижением показателя, аналогично тому, что наблюдалось в наших экспериментах.

Динамика изменения гематологических показателей под действием препарата рчГМ-КСФ в диапазоне низких доз была иной. Введение рчГМ-КСФ в дозах от 10 до 90 мкг/кг приводило к дозозависимому повышению на 6-е сутки эксперимента обоих исследованных показателей (рис. 3, 4). Более выраженной была реакция на препарат нейтрофилов: если число лейкоцитов крови в этот период составляло 62–67% от интактного уровня, то содержание нейтрофилов на 50–65% его превышало. Наиболее интенсивной гемостимулирующей активностью препарат обладал в дозе 90 мкг/кг. Число лейкоцитов

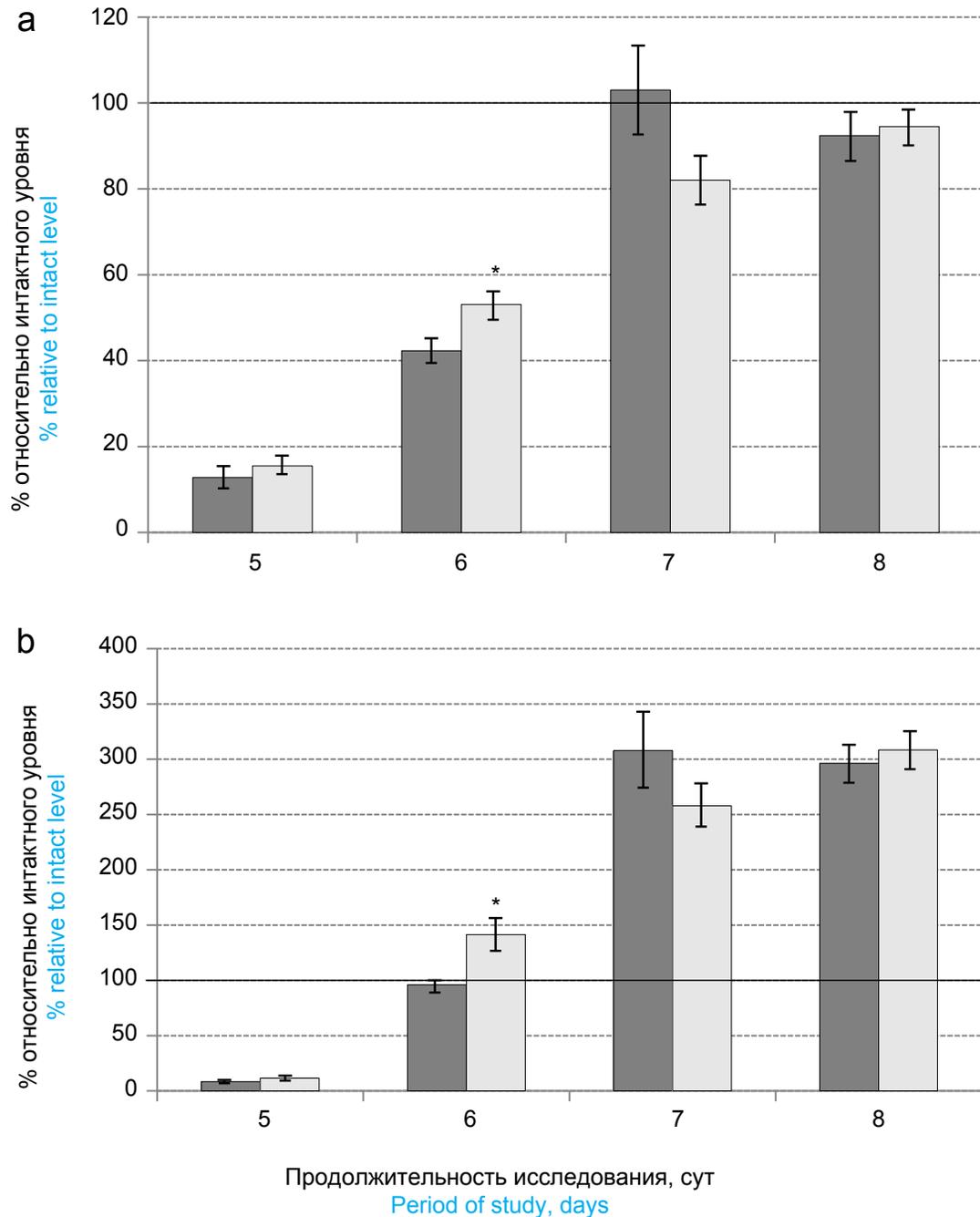


Рис. 1. Динамика изменения общего количества лейкоцитов (а) и сегментоядерных нейтрофилов (б) в периферической крови мышей СВА/Calac после введения им циклофосфана (темный столбик) или циклофосфана и рчГМ-КСФ (светлый столбик). Значения показателя приведены относительно значений показателя у интактных мышей, принятых за 100%.

* Статистически значимое отличие по отношению к контрольной группе (циклофосфан + физиологический раствор) при $p \leq 0,05$.

Fig. 1. Changes in the total number of leukocytes (a) and segmentonuclear neutrophils (b) in the peripheral blood of CBA/Calac mice after administration of cyclophosphamide (dark bar) or cyclophosphamide and rhGM-CSF (light bar). The values are given relative to the values in the intact mice taken as 100%.

* Statistically significant difference as compared to the control group (cyclophosphamide + saline solution) at $p \leq 0.05$.

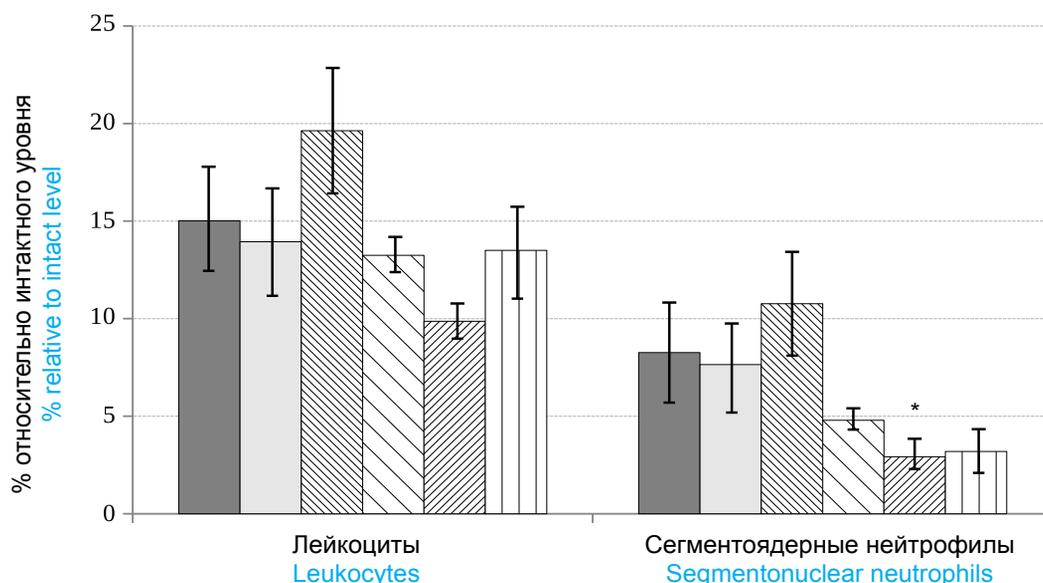


Рис. 2. Влияние препарата рчГМ-КСФ в дозах 50–175 мкг/кг на показатели периферической крови мышей СВА/Calac, подвергшихся воздействию циклофосфана. ■ циклофосфан + физиологический раствор; □ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 50 мкг/кг; ▨ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 75 мкг/кг; ▩ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 125 мкг/кг; ▪ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 150 мкг/кг; ▫ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 175 мкг/кг. Значения показателей приведены на 5-е сут после введения цитостатика относительно значений показателей у интактных мышей, принятых за 100%.

* Статистически значимое отличие по отношению к контрольной группе (ЦФ + физиологический раствор) при $p \leq 0,05$.

Fig. 2. Effect of the rhGM-CSF preparation at the doses of 50–175 µg/kg on the peripheral blood values in CBA/Calac mice exposed to cyclophosphamide. ■ cyclophosphamide + saline solution; □ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 50 µg/kg; ▨ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 75 µg/kg; ▩ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 125 µg/kg; ▪ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 150 µg/kg; ▫ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 175 µg/kg. The values obtained on the 5th day after administration of the cytostatic agent are given relative to the values in the intact mice taken as 100%.

* Statistically significant difference as compared to the control group (cyclophosphamide + saline solution) at $p \leq 0.05$.

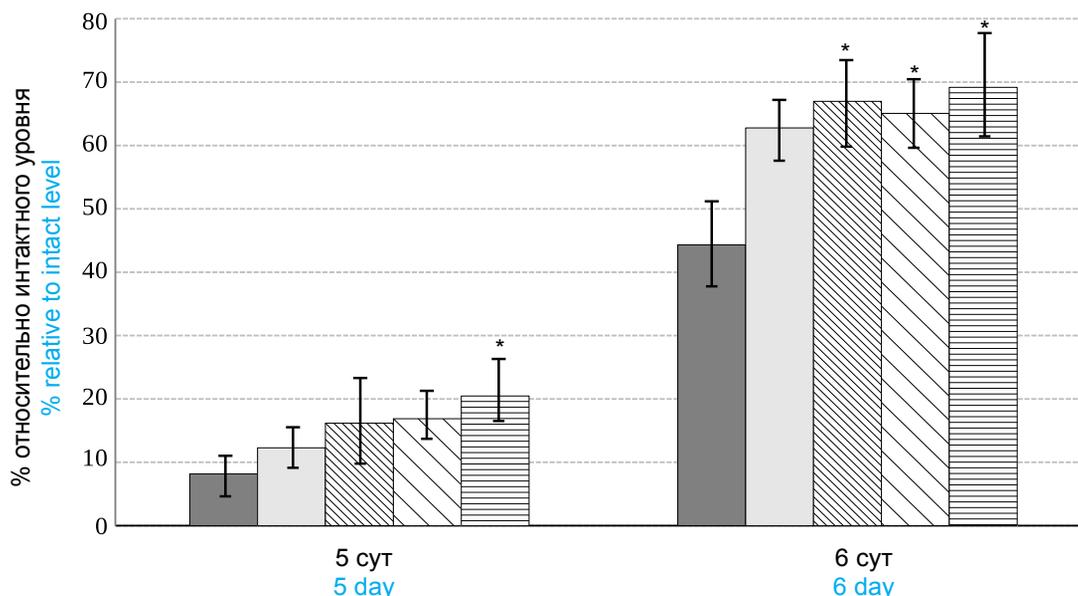


Рис. 3. Влияние препарата рчГМ-КСФ в дозах 1–90 мкг/кг на общее количество лейкоцитов в периферической крови мышей СВА/Calac, подвергшихся воздействию циклофосфана. ■ циклофосфан + физиологический раствор; □ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 1 мкг/кг; ▨ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 10 мкг/кг; ▩ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 30 мкг/кг; ▪ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 90 мкг/кг. Значения показателя приведены на 5-е и 6-е сут после введения цитостатика относительно значений показателя у интактных мышей, принятых за 100%.

* Статистически значимое отличие по отношению к контрольной группе (циклофосфан + физиологический раствор) при $p \leq 0,05$.

Fig. 3. Effect of the rhGM-CSF preparation at the doses of 1–90 µg/kg on the total number of leukocytes in the peripheral blood of CBA/Calac mice exposed to cyclophosphamide. ■ cyclophosphamide + saline solution; □ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 1 µg/kg; ▨ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 10 µg/kg; ▩ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 30 µg/kg; ▪ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 90 µg/kg. The values obtained on the 5th day after administration of the cytostatic agent are given relative to the values in the intact mice taken as 100%.

* Statistically significant difference as compared to the control group (cyclophosphamide + saline solution) at $p \leq 0.05$.

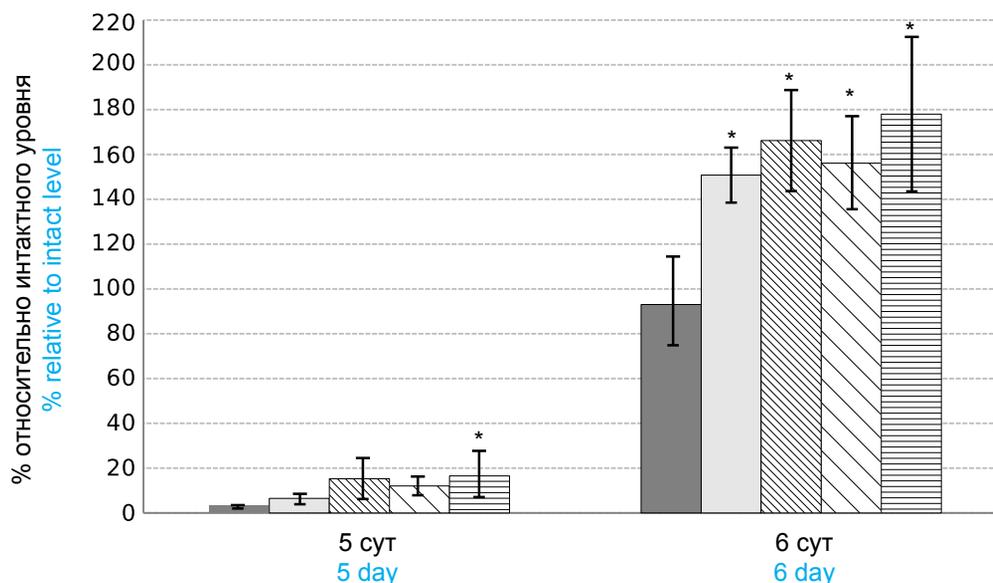


Рис. 4. Влияние препарата рчГМ-КСФ в дозах 1–90 мкг/кг на общее количество сегментоядерных нейтрофилов в периферической крови мышей СВА/Calac, подвергшихся воздействию циклофосфана. ■ циклофосфан + физиологический раствор; □ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 1 мкг/кг; ▨ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 10 мкг/кг; ▤ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 30 мкг/кг; ▥ циклофосфан + рчГМ-КСФ, 90 мкг/кг. Значения показателя приведены на 5-е и 6-е сут после введения цитостатика относительно значений показателя у интактных мышей, принятых за 100%.

* Статистически значимое отличие по отношению к контрольной группе (циклофосфан + физиологический раствор) при $p \leq 0,05$.

Fig. 4. Effect of the rhGM-CSF preparation at the doses of 1–90 µg/kg on the total number of segmentonuclear neutrophils in the peripheral blood of CBA/Calac mice exposed to cyclophosphamide. ■ cyclophosphamide + saline solution; □ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 1 µg/kg; ▨ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 10 µg/kg; ▤ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 30 µg/kg; ▥ cyclophosphamide + rhGM-CSF, 90 µg/kg. The values obtained on days 5 and 6 after administration of the cytostatic agent are given relative to the values in the intact mice taken as 100%.

* Statistically significant difference as compared to the control group (cyclophosphamide + saline solution) at $p \leq 0.05$.

и нейтрофилов на 5-е сутки после введения ЦФ в крови мышей этой группы возрастало по сравнению с контролем соответственно в 2,8 и 6 раз, на 6-е сутки — в 1,6 и 1,9 раза.

Ни в один из периодов наблюдения не было обнаружено достоверных различий между опытными и контрольной группами мышей в содержании моноцитов крови, хотя тенденция к увеличению показателя на 5-е сутки после введения ЦФ была выраженной (число моноцитов в группах мышей, которым вводили препарат рчГМ-КСФ в дозах от 1 до 90 мкг/кг, в 2,4–3 раза превышало уровень этого показателя в контроле).

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследованный препарат рчГМ-КСФ проявляет выраженные гемостимулирующие свойства, ускоряя восстановление общего числа лейкоцитов и нейтрофилов периферической крови мышей на фоне цитостатической миелосупрессии.

Выводы

1. Установлено, что препарат рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониястимулирующего фактора человека, полученный по улучшенной технологии, усиливал пролиферативную активность клеток промиелоцитарной лейкемии HL-60.

2. В системе *in vivo* продемонстрирована способность препарата рчГМ-КСФ стимулировать восстановление процессов гемопоэза в условиях его ингибирования введением цитостатика циклофосфана, что проявлялось в повышении общего числа лейкоцитов и нейтрофилов периферической крови мышей СВА/Calac. Определен диапазон эффективных доз и схема применения препарата, оптимальные для обеспечения его гемостимулирующей активности.

Вклад авторов. Г. Г. Шими́на — проведение экспериментальных исследований *in vivo*, анализ и систематизация экспериментальных данных, интерпретация результатов исследования, работа с графическим материалом, написание текста статьи и ее оформление; А. В. Батенева — сбор, анализ и обобщение данных литературы, проведение экспериментальных исследований *in vitro*, анализ и систематизация экспериментальных данных, интерпретация результатов исследования, написание текста статьи; С. Г. Гамале́й — планирование и разработка дизайна экспериментального исследования, формулировка темы исследования, сбор данных литературы, разработка дизайна статьи, доработка текста статьи; Т. И. Еси́на — получение препарата рчГМ-КСФ для исследования; Т. Г. Терещенко — характеристика препарата рчГМ-КСФ по физико-химическим показателям; Е. Д. Даниленко — утверждение темы и плана экспериментального исследования, обобщение и систематизация результатов исследования, редактирование и критический пересмотр содержания текста статьи, формулирование выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. Galina G. Shimina—performing experiments *in vivo*, analysis and systematisation of experimental data, interpretation of the study results, preparation of the graphic material, writing and formatting the text of the paper; Alena V. Bateneva—collection, analysis, and systematisation of literature data, performing experiments *in vitro*, analysis and systematisation of experimental data, interpretation of the study results, writing the text of the paper; Svetlana G. Gamaley—planning and development of the design of experiments, elaboration of the study idea, collection of literature data, development of the paper design, revision and editing of the text; Tatyana I. Esina—production of the rhGM-CSF preparation for the study; Tatyana G. Tereshchenko—physical and chemical characterisation of the rhGM-CSF preparation; Elena D. Danilenko—ap-

proval of the idea and plan of the experimental part of the study, summarising and systematisation of the study results; editing and revision of the text, formulation of conclusions, approval of the final version of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора № 13/18 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118062290093-9).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 13/18 and was supported by the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" (R&D public accounting No. АААА-А18-118062290093-9).

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. Багрова СГ. Гранулоцитарные колониестимулирующие факторы в профилактике фебрильной нейтропении. *Эффективная фармакотерапия*. 2015;(31):6–15. [Bagrova SG. Granulocyte colony-stimulating factors in prevention of febrile neutropenia. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*. 2015;(31):6–15 (In Russ.)]
2. Мальцев ДВ. Показания к применению колониестимулирующих факторов в клинической практике. *Клиническая иммунология, аллергология и инфектология*. 2018;(1):5–12. [Maltsev DV. Indications for the use of colony-stimulating factors in clinical practice. *Klinicheskaya immunologiya. Allergologiya. Infektologiya = Clinical Immunology. Allergology. Infectology*. 2018;(1):5–12 (In Russ.)]
3. Половинкина ВС, Косоруков ВС. Рекомбинантный чГМ-КСФ в онкологии. *Российский биотерапевтический журнал*. 2009;8(1):29–39. [Polovinkina VS, Kosorukov VS. Recombinant hGM-CSF in antitumor therapy. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2009;8(1):29–39 (In Russ.)]
4. Газатова НД, Меняйло МЕ, Малащенко ВВ, Гончаров АГ, Мелашенко ОБ, Морозова ЕМ, Селедцов ВИ. Прямые эффекты гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора на функциональные свойства моноцитов/макрофагов человека. *Медицинская иммунология*. 2019;21(3):419–26. [Gazatova ND, Meniailo ME, Malashchenko VV, Goncharov AG, Melashchenko OB, Morozova EM, Seledtsov VI. Direct effects of GM-CSF on the functions of human monocytes/macrophages. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2019;21(3):419–26 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-3-419-426>
5. Warren TL, Weiner GJ. Uses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in vaccine development. *Curr Opin Hematol*. 2000;7(3):168–73. <https://doi.org/10.1097/00062752-200005000-00007>
6. Белогурова МБ. Клиническое использование гемопоэтических ростовых факторов. *Практическая онкология*. 2003;4(3):183–90. [Belogurova MB. Clinical use of hematopoietic growth factors. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology*. 2003;4(3):183–90 (In Russ.)]
7. Francisco-Cruz A, Aguilar-Santelises M, Ramos-Espinosa O, Mata-Espinosa D, Marquina-Castillo B, Barrios-Payan J, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. *Med Oncol*. 2014;31(1):774. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0774-6>
8. Libby RT, Braedt G, Kronheim SR, March CJ, Urdal DL, Chiaverotti SR, et al. Expression and purification of native human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from an *Escherichia coli* secretion vector. *DNA*. 1987;6(3):221–9. <https://doi.org/10.1089/dna.1987.6.221>
9. Delamarter J, Ernst JF. Human granulocyte-macrophage colony stimulating factor-like polypeptides and process for producing them in high yields in microbial cells. WO1987002060. 1987.
10. Есина ТИ, Лебедев ЛР, Волосникова ЕА, Гилева ИП, Гогина ЯС, Терещенко ТА и др. Способ получения рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека. *Биотехнология*. 2019;35(3):68–73. [Esina TI, Lebedev LR, Volosnikova EA, Gileva IP, Gogina YaS, Tereshchenko TA, et al. Method for obtaining recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Biotechnologia = Biotechnology*. 2019;35(3):68–73 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-3-68-73>
11. Гилева ИП, Есина ТИ, Волосникова ЕА, Гогина ЯС, Лебедев ЛР, Даниленко ЕД. Рекомбинантная плазмидная ДНК p280_2GM, кодирующая полипептид со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека, штамм E. COLI SG 20050/p280_2GM — продуцент полипептида со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека и способ получения указанного полипептида. Патент Российской Федерации № 2708556; 2019. [Gileva IP, Esina TI, Volosnikova EA, Gogina YaS, Lebedev LR, Danilenko ED. Recombinant plasmid DNA p280_2GM coding polypeptide with properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor of human, strain *Escherichia coli* SG 20050/p280_2GM — producer of polypeptide with properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor of human and method of obtaining of said polypeptide. Patent of the Russian Federation № 2708556; 2019 (In Russ.)]
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
14. Yamaguchi T, Yamaguchi T, Kogi M, Yamamoto Y, Hayakawa T. Bioassay of human granulocyte colony-stimulating factor using human promyelocytic HL-60 cells. *Biol Pharm Bull*. 1997;20(9):943–7. <https://doi.org/10.1248/bpb.20.943>
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
16. Масычева ВИ, Даниленко ЕД, Шмина ГГ, Гвоздева ТС, Алямкина ЕА, Долгова ЕВ и др. Изучение гемостимулирующей активности нуклеопротеидного комплекса, выделенного из плаценты человека. *Сибирский онкологический журнал*. 2012;(5):34–8. [Masycheva VI, Danilenko ED, Shimina GG, Gvozdeva TS, Alyamkina EA, Dolgova EV, et al. Study of hemostimulating activity of nucleoprotein complex extracted from the human placenta. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*. 2012;(5):34–8 (In Russ.)]
17. Новицкий ВВ, Евтушенко ОМ. *Руководство к практическим занятиям по гематологии*. Томск: Сибирский медицинский университет; 1999. [Novitskiy VV, Evtushenko OM. *A guide to practical studies on hematology*. Tomsk: Siberian Medical University; 1999 (In Russ.)]
18. Гржибовский АМ. Анализ трех и более независимых групп количественных данных. *Экология человека*. 2008;(3):50–8. [Grjibovskiy AM. Analysis of three and more independent groups quantitative data. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*. 2008;(3):50–8 (In Russ.)]
19. Гражданцева АА, Сиволобова ГФ, Ткачева АВ, Гилева ИП, Кулигина ЕВ, Рихтер ВА, Кочнева ГВ. Высокоэффективная продукция биологически активного секретруемого гранулоцитарно-макрофагаль-

- ного колониестимулирующего фактора человека рекомбинантным вирусом осповакцины. *Биотехнология*. 2015;31(5):13–21. [Grazhdantseva AA, Sivolobova GF, Tkacheva AV, Gileva IP, Kuligina EV, Rikhter VA, Kochneva GV, et al. Highly effective production of biologically active, secreted, human granulocyte macrophage colony-stimulating factor by recombinant vaccinia virus. *Biotechnologiya = Biotechnology*. 2015;31(5):13–21 (In Russ.)]
20. Веселовский ВА, Веселова ТВ, Чернавский ДС. Трехфазная (парадоксальная) дозовая зависимость реакции растительной клетки на факторы внешней среды. *Российский химический журнал*. 1999;43(5):49–54. [Veselovsky VA, Veselova TV, Chernavsky DS. Three-phase (paradoxical) dose-dependent response of a plant cell to environmental factors. *Rossiyskiy khimicheskiy zhurnal = Russian Journal of General Chemistry*. 1999;43(5):49–54 (In Russ.)]
21. Parmiani G, Castelli C, Pilla L, Santinami M, Colombo MP, Rivoltini L. Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Ann Oncol*. 2007;18(2):226–32. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl158>
22. Sun L, Rautela J, Delconte RB, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Carrington EM, Schenk RL, et al. GM-CSF quantity has a selective effect on granulocytic vs. monocytic myeloid development and function. *Front Immunol*. 2018;9:1922.

Об авторах / Authors

Шими́на Галина Григорьевна. Galina G. Shimina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1078-7033>

Батенева Алена Владимировна. Alena V. Bateneva. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3761-7798>

Гамале́й Светлана Георгиевна. Svetlana G. Gamaley. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7441-333X>

Еси́на Татьяна Игоревна. Tatyana I. Esina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9006-8313>

Терещенко Татьяна Геннадьевна. Tatyana G. Tereshchenko. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4586-0875>

Даниленко Елена Дмитриевна, канд. биол. наук. Elena D. Danilenko, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

Поступила 12.10.2020

После доработки 18.11.2020

Принята к публикации 04.12.2020

Received 12 October 2020

Revised 18 November 2020

Accepted 4 December 2020

Теоретическое и экспериментальное обоснование перспективных методов экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой

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

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

Вакцинация против сибирской язвы проводится в соответствии с национальным Календарем профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Для иммунизации людей применяется живая вакцина, представляющая собой лиофилизированную взвесь спор вакцинного штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1 в стабилизирующей среде. Усовершенствование контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов посредством внедрения современных стандартных методов контроля является актуальной и неотъемлемой частью системы менеджмента качества. **Цель работы:** совершенствование экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» и «Специфическая активность» (общая концентрация спор). **Материалы и методы:** испытание по показателям качества «Подлинность» и «Специфическая активность» (общая концентрация спор) проводили на образцах вакцины сибиреязвенной живой серии 266 производства ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Исследование иммунохроматографическим методом показателя качества вакцины «Подлинность» проводили с помощью набора реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы «ИХ тест-система *B. anthracis*» производства ФГБУ «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора (г. Оболensk); контроль показателя качества вакцины «Специфическая активность» (общая концентрация спор) проводили визуальным и расчетным методами с применением камеры Горяева и отраслевого стандартного образца (ОСО) мутности бактериальных взвесей 10 МЕ — ОСО 42-28-85 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); испытание по показателю качества «Специфическая активность» (количество живых спор) сибиреязвенной вакцины проводили микробиологическим методом (посевом на питательные среды). Статистическая обработка результатов была выполнена с помощью программы Microsoft Excel и Statistica 10.0. **Результаты:** теоретически обоснована и экспериментально доказана возможность применения иммунохроматографического метода как альтернативного для оценки показателя «Подлинность» вакцины сибиреязвенной живой. При проведении данного испытания препарат следует разводить до концентраций 10^8 и 10^9 м.к./мл. Разработана методика определения общей концентрации спор (показатель «Специфическая активность») вакцины сибиреязвенной живой с применением ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ. Предложена формула расчета общей концентрации спор в вакцине. **Вывод:** предложенные методики экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой могут быть рекомендованы для включения в нормативную документацию в качестве альтернативных. **Ключевые слова:** вакцина сибиреязвенная живая; *Bacillus anthracis* СТИ-1; подлинность; специфическая активность; общая концентрация спор *Bacillus anthracis* СТИ-1; концентрация живых спор; колониеобразующая единица (КОЕ); камера Горяева; ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ

Для цитирования: Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Теоретическое и экспериментальное обоснование перспективных методов экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(4):277–284. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-277-284>
* **Контактное лицо:** Касина Ирина Владимировна; kasina@expmcd.ru

Theoretical and Experimental Substantiation of Alternative Methods for Quality Control of Live Anthrax Vaccine

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

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

Preventive immunisation against anthrax is carried out in accordance with the national Immunisation Schedule for Epidemic Settings. The vaccination is performed using a live vaccine—a freeze-dried suspension of *Bacillus anthracis* STI-1 vaccine strain spores in a stabilizing media. Improvement of the quality control of immunobiological medicines is a pressing issue and an integral part of the quality management system. **The aim of study** was to streamline quality control of live anthrax vaccine in terms of the following test parameters: identification and specific activity (total spore concentration). **Materials and methods:** identification and specific activity (total spore concentration) tests were performed for samples of live anthrax vaccine, batch 266, produced by the 48 Central Scientific Research Institute. The identification test was performed using the *B. anthracis* immunochromatography test kit for express detection and identification of anthrax pathogen spores produced by the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (Obolensk). The specific activity (total spore concentration)

was assessed by the visual method and calculated in the Goryaev chamber using the industry reference standard of bacterial suspension turbidity equivalent to 10 IU—OSO 42-28-85 (by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products). The number of live spores in live anthrax vaccine was determined by the microbiological method (by inoculating media). The statistical processing of the results was performed using Excel and Statistica 10.0. **Results:** the authors provided theoretical and experimental substantiation to support the feasibility of using immunochromatography as an alternative identification test method for live anthrax vaccine. Test samples dilutions of 10^8 microbial cells per millilitre and 10^9 microbial cells per millilitre are used in the test. The authors developed a test procedure for determination of the total spore concentration (specific activity) in live anthrax vaccine using an industry reference standard of turbidity equivalent to 10 IU, and proposed a formula for calculation of the total spore concentration. **Conclusions:** the developed test procedures could be recommended for inclusion in the live anthrax vaccine specification files as alternative methods of quality control.

Key words: live anthrax vaccine; *Bacillus anthracis* STI-1; identification; specific activity; total spore concentration; live spore concentration; colony-forming unit (CFU); Goryaev chamber; industry reference standard of bacterial suspension turbidity equivalent to 10 IU

For citation: Kasina IV, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI. Theoretical and experimental substantiation of alternative methods for quality control of live anthrax vaccine. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):277–284. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-277-284>

* **Corresponding author:** Irina V. Kasina; kasina@xpmmed.ru

Сибирская язва относится к зооантропонозам и является особо опасным инфекционным заболеванием. Эпидемические проявления сибирской язвы имеют большую социальную и экономическую значимость в связи с существованием естественных резервуаров сибиреязвенного микроба, которыми являются скотомогильники и стационарно неблагоприятные территории. Возбудитель сибирской язвы длительно сохраняется в почве не только жизнеспособность, но и вирулентность, что делает борьбу с сибирской язвой важной и долгосрочной задачей медицины и ветеринарии [1–4]. И в настоящее время эпидемиологическая обстановка по сибирской язве в России оценивается как напряженная и не имеющая тенденции к стабилизации. Спорадические случаи и эпидемические вспышки заболевания регистрируются постоянно [5]. Высокая патогенность сибиреязвенного микроба в сочетании с уникальной устойчивостью его спор к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды ставят его в разряд крайне опасных биологических агентов, используемых в качестве средства биотеррора [6]. В нашей стране надежной защитой населения от заражения сибирской язвой является вакцинопрофилактика [7–9]. Так, например, при отсутствии вакцинации и ревакцинации контингентов риска в 2018 г. в Российской Федерации на территориях республик Дагестан и Тыва вследствие контакта с больными животными были отмечены 3 случая заболевания сибирской язвой¹. Вакцинация против сибирской язвы проводится гражданам в соответствии с национальным Календарем профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Вакцинации подлежат лица, работающие с живыми культурами возбудителя сибирской язвы, а также проводящие убой скота и выполняющие сельскохозяйственные, строительные, заготовительные, промысловые, геологические работы на энзоотичных по сибирской язве территориях. Для иммунизации людей применяется живая вакцина, представляющая собой лиофилизированную взвесь живых спор вакцинного штамма *Bacillus anthracis* STI-1 в стабилизирующей среде [7–9]. Первичная иммунизация проводится двукратно с интервалом 20–30 суток, ревакцинация — ежегодно однократно. Вакцина сибиреязвенная живая вызывает формирование специфического иммунитета продолжительностью до 1 года.

Контроль качества вакцины сибиреязвенной перед выпуском в гражданский оборот проводится с целью подтверждения соответствия показателей качества требованиям нормативной документации (НД)² на производстве и в отделе биотехнологического контроля (ОБТК) предприятия-производителя, а также в аккредитованном испытательном центре. Контроль качества вакцины осуществляется по всем показателям, предусмотренным требованиями НД для живых вакцин в лиофилизированной форме. К показателям качества, определяемым визуальными методами, относятся: описание, время растворения, показатели дисперсности суспензии; к физико-химическим показателям: pH, потеря в массе при высушивании, средняя масса и отклонения от средней массы; к биологическим: специфическая безопасность, иммуногенность для морских свинок; к микробиологическим: подлинность, отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов, специфическая активность (общая концентрация спор, количество живых спор).

Усовершенствование контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов посредством внедрения современных стандартных методов контроля является актуальной и неотъемлемой частью системы менеджмента качества [10, 11].

Цель работы — совершенствование экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой по показателям «Подлинность» и «Специфическая активность» (общая концентрация спор).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- теоретически обосновать применение перспективных методов экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой по показателям «Подлинность» и «Специфическая активность» (общая концентрация спор);
- экспериментальная оценка возможности применения иммунохроматографического метода в качестве альтернативного для оценки показателя «Подлинность» вакцины сибиреязвенной живой с использованием тест-системы иммунохроматографической;
- разработка методики определения показателя «Специфическая активность» (общая концентрация спор) вакцины сибиреязвенной живой с использованием отраслевого стандартного образца (ОСО) мутности бактериальных взвесей 10 ME.

¹ Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году». М.: Роспотребнадзор; 2019.

² Нормативная документация Р N001273/01-161019 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и кожного скарификационного нанесения.

Фармакопейная статья 3.3.1.0016.15 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и кожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Материалы и методы

Материалы:

- вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения, 100 подкожных или 10 накожных доз, серия 266 (общая концентрация — от 4 до 6 млрд спор/1 мл (по паспорту — 5,5 млрд спор/мл); вторая форма выпуска; ампульная форма) производства ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России;

- ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (ОСО 42-28-85П) (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), буква «П» означает год выпуска (ОСО мутности);

- мясо-пептонный агар (МПА) лабораторного приготовления, pH 7,2;

- набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы «ИХ тест-система *B. anthracis*» производства ФГБУ «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора (г. Оболенск) по ТУ 9398-093-78095326-2008 (регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05485), срок годности 1 год.

Питательная среда для культивирования сибиреязвенного микроба предусмотрена требованиями НД.

Все препараты использованы в течение срока их годности.

Методы:

1. «ИХ тест-система *B. anthracis*» представляет собой пластиковую диагностическую панель (футляр) с лункой для внесения образца и с окошком для считывания результатов (рис. 1). Согласно инструкции по применению «ИХ тест-система *B. anthracis*» обеспечивает видоспецифическое выявление и идентификацию спор *B. anthracis* в суспензиях, полученных из колоний микроорганизмов, выращенных на «голодном» агаре в течение 10 сут при температуре 30–31 °С и в суспензиях, полученных из объектов внешней среды путем специальной пробоподготовки в концентрации 10⁸ спор/мл³. Вакцина сибиреязвенная представляет собой лиофилизированную взвесь живых спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 в стабилизирующей среде; соответственно, пробоподготовку исследуемого образца вакцины для получения спор не проводят. Исходя из указанной в паспорте на серию вакцины общей концентрации спор (5,5 млрд спор/мл), образец препарата разводили в 0,01 М натрий-фосфатном буферном растворе (pH 7,4) до концентрации 10⁹ спор/мл. Буферный раствор готовят *ex tempore*, стерилизация раствора не требуется. До концентрации 10⁸ спор/мл образец вакцины разводили по стандартному образцу мутности бактериальных взвесей 10 МЕ. Один образец дополнительно центрифугировали при 2000 об/мин в течение 2 мин, далее постановку теста и учет результатов осуществляли в соответствии с инструкцией по применению на набор «ИХ тест-система *B. anthracis*». Для этого приготовленные разведения препарата в объеме 0,1 мл вносили на диагностическую панель. Через 15–20 мин учитывали результат⁴.

Положительным результатом на присутствие спорowego сибиреязвенного антигена считали наличие видимых невооруженным глазом красных линий в зоне «С» и «Т», где зона «С» —

контрольная полоса, а зона «Т» — опытная полоса. При этом интенсивность цвета полос не учитывали. Интенсивность полос в зоне «С» и «Т» может отличаться. Об отрицательном результате свидетельствует наличие красной линии только в зоне «С». В связи с тем что в наши задачи не входило изучение специфичности набора «ИХ тест-система *B. anthracis*», так как он является зарегистрированным коммерческим препаратом с заявленной чувствительностью и специфичностью, контрольной пробой послужили не образцы других вакцин против особо опасных инфекционных заболеваний, а 0,01 М натрий-фосфатный буферный раствор, которым разводили образцы вакцины сибиреязвенной.

2. Определение общей концентрации спор. Параллельные исследования по определению общей концентрации спор в соответствии с НД⁵ с применением камеры Горяева и с помощью ОСО мутности 10 МЕ проводили на 10 различных образцах вакцины сибиреязвенной, в которых общая концентрация спор в соответствии с паспортом на серию составила 5,5 млрд спор/мл.

Вакцину восстанавливали в 1 мл стерильной дистиллированной воды.

В соответствии с НД⁶ общую концентрацию спор (ОК) в вакцине определяли путем их подсчета в камере Горяева и рассчитывали по формуле:

$$OK = 25000 \cdot n \cdot p, \quad (1)$$

где ОК — общее число спор в ампуле или флаконе в 1 мл; n — количество спор в 10 больших квадратах камеры Горяева; p — кратность разведения; 25000 — постоянная величина для камеры данного типа.

Исходя из полученной общей концентрации спор в образцах вакцины препарат разводили до концентрации 1000 спор в 1 мл и высевали по 0,1 мл на 5 чашек Петри с МПА (посевная доза составила условно 100 спор) для установления количества живых спор.

Чтобы определить общую концентрацию спор в вакцине по ОСО мутности, 0,1 мл восстановленного препарата вносили в стерильные пробирки, аналогичные тем, в которых выпускается ОСО мутности. Затем визуально доводили концентрацию дистиллированной водой до мутности 10 МЕ, что эквивалентно концентрации 1×10⁸ спор сибирской язвы/мл (в соответствии с инструкцией по применению на ОСО мутности). После этого десятикратными разведениями доводили до концентрации 1000 спор/мл и высевали по 0,1 мл на 3 чашки Петри с МПА. Посевная доза при этом также составила условно 100 спор в соответствии с методикой, указанной в НД.

3. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel. Статистическую значимость различий средних значений концентрации спор *B. anthracis* СТИ-1 в вакцине сибиреязвенной живой, полученной с помощью камеры Горяева и ОСО мутности бактериальных взвесей, оценивали с применением непараметрического U -критерия Манна — Уитни (программа Statistica 10.0).

Результаты и обсуждение

В соответствии с ОФС 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты⁷ подлинность лекарственного пре-

³ Диагностические препараты. Каталог продукции. ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора. Оболенск; 2018. https://www.obolensk.org/files/sredy/OBOLENSK_Katalog.pdf

⁴ Там же.

⁵ Нормативная документация Р N001273/01-161019 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения.

Фармакопейная статья 3.3.1.0016.15 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁶ Там же.

⁷ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2.; 2018.

парата определяется различными лабораторными методами (биологическими, иммунобиологическими, молекулярными, химическими и физико-химическими), позволяющими специфически идентифицировать лекарственный препарат. В соответствии с требованиями НД на вакцину⁸ сибирезвенную живую испытание по показателю «Подлинность» проводится при микроскопии мазка из восстановленного препарата, окрашенного по Цилю — Нильсену. В мазках должны наблюдаться овальные споры розового цвета с красным ободком по периферии. Метод основывается на различиях в устойчивости к красителям (карболовому фуксину и метиленовому синему) жизнеспособных и дефектных спор. В результате окрашивания жизнеспособные клетки приобретают розовый цвет с четким темно-красным ободком, а дефектные — темно-красный (рубиновый), в отдельных случаях вплоть до синего. Считаем, что данный метод объективно не отражает подлинность вакцины сибирезвенной, так как к роду *Bacillus* относятся и другие близкородственные микроорганизмы (например, *B. cereus*), имеющие округлые споры, диаметр которых не превышает ширину микробной клетки, и соответственно, также окрашиваются по Цилю — Нильсену [12]. Этот метод определения жизнеспособных спор в вакцине, на наш взгляд, является дополнительным к методу посева на питательные среды и обязательным на нескольких этапах производства вакцины при получении концентрированной споровой суспензии. Считаем, что для определения качества показателя «Подлинность» готовой лекарственной формы вакцины сибирезвенной живой необходим другой метод.

В лабораторной диагностике для обнаружения возбудителя сибирской язвы или его компонентов (ДНК, антигены) используются зарегистрированные диагностические наборы, основанные на методе флуоресцирующих антител, реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), иммунохроматографии, ПЦР,

чувствительности к фагам, реакции латекс-агглютинации и выделения чистых культур на питательных средах [13].

В последние 10 лет все большую популярность приобретают иммунохроматографические экспресс-тесты, которые позволили повысить чувствительность, специфичность и качество анализа; они широко применяются в медицине, лабораторной диагностике, в ветеринарии и сельском хозяйстве. Иммунохроматографический метод основан на принципе тонкослойной хроматографии и реакции между антигеном и соответствующим ему антителом, меченным цветной или флуоресцентной меткой. Проводится анализ с помощью специальных тест-полосок, панелей или тест-кассет. Основными преимуществами использования иммунохроматографических тест-систем являются:

- простота и удобство (позволяет получить результат без дополнительного оборудования);
- надежность (достоверность тестов достигает 92–99,8%, при этом каждый тест имеет встроенный внутренний контроль);
- экономичность (минимальные затраты на приобретение теста и экономия времени на проведение испытания)⁹.

ИХ-тесты также успешно применяются в лабораторной диагностике особо опасных инфекционных заболеваний, в том числе и сибирской язвы [14–16].

Нами в качестве альтернативного метода испытания вакцины сибирезвенной по показателю «Подлинность» был также выбран иммунохроматографический метод, который позволяет специфически идентифицировать сибирезвенный спорный антиген. Далее проведен анализ зарегистрированных на территории Российской Федерации иммунохроматографических тест-систем для диагностики возбудителя сибирской язвы.

В таблице 1 представлены отечественные и зарубежные разработки иммунохроматографических тест-систем.

Таблица 1. Отечественные и зарубежные разработки иммунохроматографических тест-систем для выявления антигенов возбудителя сибирской язвы

Table 1. Russian and foreign immunochromatography test kits for the detection of anthrax pathogen antigens

Наименование разработки Test kit	Производитель Manufacturer	Назначение разработки Intended use	Источник Source
Укладка УИХЭ-1	ФГУП «ГосНИИБП» ФМБА России	Для выявления антигенов возбудителя чумы, сибирской язвы, туляремии, сапа, биологических токсинов. Чувствительность — 1×10 ⁶ м.к./мл	Сноска ¹⁰
Panel of detection reagents for immunochromatography UIHE-1	State Research Centre for Biological Instrumentation Technology	Detection of antigens of the following pathogens: plague, anthrax, tularemia, equinia, and biological toxins. Sensitivity: 1×10 ⁶ MC/mL	Reference ¹⁰
Устройство RAMP	Response Biomedical Corp, Канада	Для выявления сибирской язвы (официально рекомендовано FDA), натуральной оспы, ботулотоксина, рицина. Чувствительность — 4×10 ³ спор/мл	Сноска ¹¹
Rapid analyte measurement platform (RAMP)	Response Biomedical Corp, Canada	Detection of anthrax (recommended by FDA), smallpox, botulinum toxin, ricin. Sensitivity: 4×10 ³ spores/mL	Reference ¹¹
Набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы («ИХ тест-система <i>B. anthracis</i> »)	ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора (г. Оболенск)	Для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы. Чувствительность — 1×10 ⁸ м.к./мл	Сноска ¹²
Immunochromatography test kit for express detection and identification of anthrax pathogen spores (<i>B. anthracis</i> IC test kit)	The State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (Obolensk)	Express detection and identification of anthrax pathogen spores. Sensitivity: 1×10 ⁸ MC/mL	Reference ¹²

Note. MC/mL—microbial cells per millilitre.

⁸ Там же.

⁹ Иммунохроматографические экспресс-тесты как оптимальное решение в условиях ограниченного бюджета. Главный врач юга России. 2019;4(68):12.

¹⁰ CBRN centre Qazaqstan. <https://cbrn.kz/ukladka-immunohromatograficheskikh-indikatornyh-elementov-uihe-1/>

¹¹ responsebio.com

¹² Диагностические препараты. Каталог продукции. ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора. Оболенск; 2018. https://www.obolensk.org/files/sredy/OBOLENSK_Katalog.pdf

Отечественные ИХ тест-системы просты и удобны в применении, так как в учете результатов применяется цветная метка. В зарубежных иммунохроматографических тест-системах используется флуоресцентная метка, для учета которой необходим специальный анализатор. В связи с тем что укладка УИХЭ-1 и ИХ тест-системы для устройства RAMP выпускаются в комплекте для идентификации нескольких возбудителей, соответственно, для экспертизы качества одной вакцины неудобны в применении.

В нашем исследовании вакцины сибиреязвенной по показателю качества «Подлинность» мы впервые применили зарегистрированный на территории Российской Федерации диагностический набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы «ИХ тест-система *B. anthracis*» производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора (г. Оболенск). Вакцина представляет собой лиофилизированную взвесь живых спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 в стабилизирующей среде, соответственно, пробоподготовка образцов для исследования занимает минимальное время.

Полученные результаты испытаний представлены на рисунке 2. Установлено, что в образцах вакцин в концентрации 10^9 спор/мл, подвергнутых и не подвергнутых центрифугированию, были отчетливо видны полосы, свидетельствующие о наличии сибиреязвенного спорового антигена. Более четкий результат получен с образцом вакцины с концентрацией 10^8 спор/мл, предварительно подвергнутый центрифугированию. Полученный результат, возможно, обусловлен наличием других компонентов (например, сахарозы), которые влияют на процесс обнаружения спор в образцах вакцины в концентрации 10^8 спор/мл. Таким образом, рекомендуемая нами концентрация вакцины сибиреязвенной живой для проведения испытания по показателю «Подлинность» составляет 10^9 спор/мл разведенной восстановленной формы или 10^8 спор/мл с предварительным центрифугированием пробы. В контроле получен отрицательный результат. Учитывая простоту и удобство, надежность и экономичность набор «ИХ тест-система *B. anthracis*» является эффективным экспресс-методом для видоспецифического выявления спор *B. anthracis* в образцах вакцины с концентрацией 10^8 и 10^9 спор/мл.

Одним из главных показателей качества вакцины сибиреязвенной живой является «Специфическая активность», обусловленная общей концентрацией спор и количеством живых спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1. В отличие от других бактериальных живых вакцин, таких как чумная, туляремиальная, бруцеллезная и туберкулезная¹³, в которых количество прививочных доз в ампуле определяется исходя из фактического содержания живых микробных клеток, в сибиреязвенной вакцине количество прививочных доз рассчитывается из общей концентрации спор. При этом количество живых спор должно составлять не менее 40% от общей концентрации и определяется методом посева на питательные среды.



Рис. 1. Набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы «ИХ тест-система *B. anthracis*». Fig. 1. Immunochromatography test kit for express detection and identification of anthrax pathogen spores (*B. anthracis* IC test kit).

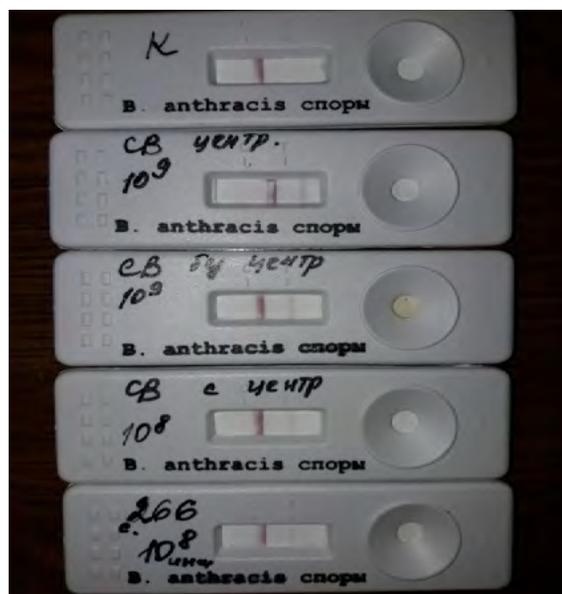


Рис. 2. Результаты испытаний вакцины сибиреязвенной живой с применением иммунохроматографической тест-системы *B. anthracis* по показателю «Подлинность». К — контроль (0,01 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7,4); CB_{центр} — проба вакцины сибиреязвенной живой, подвергнутая предварительному центрифугированию; CB_{без центр} — проба вакцины сибиреязвенной живой без предварительного центрифугирования; 266 — вакцина сибиреязвенная живая серии 266. Fig. 2. Results of the identification test for live anthrax vaccine that were obtained using the *B. anthracis* IC test kit. К—control (0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.4); CB_{центр}—pre-centrifuged sample of live anthrax vaccine; CB_{без центр}—non-centrifuged sample of live anthrax vaccine; 266—live anthrax vaccine batch 266.

¹³ Фармакопейная статья 3.3.1.0022.15 Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0019.15 Вакцина туляремиальная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0011.15 Вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0018.15 Вакцина туберкулезная БЦЖ живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Таблица 2. Результаты испытания вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Специфическая активность» (общая концентрация спор, количество живых спор)

Table 2. Results of the specific activity test for live anthrax vaccine (total spore concentration, live spore concentration)

Номер образца Sample	Общая концентрация спор в вакцине ($n \times 10^9$ спор/мл), определенная... Total spore concentration in the vaccine ($n \times 10^9$ spores/mL) calculated using...		Среднее количество выросших колоний (КОЕ) из взвеси спор вакцины, приготовленной... Mean number of colonies (CFU) grown from the vaccine spore suspension prepared...		Расчетная концентрация живых спор в взвеси (%), приготовленной... Estimated concentration of live spores (%) in the suspension prepared...	
	по ОСО мутности 10МЕ the industry reference standard of turbidity equivalent to 10 IU	в камере Горяева (по НД) the Goryaev chamber (according to the product specification file)	по ОСО мутности 10 МЕ (~100 спор) using the industry reference standard of turbidity equivalent to 10 IU (~100 spores)	по НД (~100 спор) according to the product specification file (~100 spores)	по ОСО мутности 10 МЕ using the industry reference standard of turbidity equivalent to 10 IU	по НД according to the product specification file
1	4,4	4,5	73	51	73	51
2	4,0	4,0	43	36	43	36
3	5,5	6,0	77	41	77	41
4	4,3	4,3	64	60	64	60
5	4,0	4,0	49	54	49	54
6	4,5	4,8	64	38	64	38
7	5,0	4,9	55	45	55	45
8	4,3	4,6	76	63	76	63
9	4,1	4,0	40	40	40	40
10	4,0	4,4	58	46	58	46
Хсп ± S	4,41 ± 0,5	4,55 ± 0,6	60 ± 13	45 ± 12	60 ± 13	45 ± 12

Примечание. ОСО — отраслевой стандартный образец, НД — нормативная документация, 100 спор — проводили посев расчетных 100 спор.
Note. 100 spores—inoculation of estimated 100 spores.

В живых вакцинах против особо опасных инфекционных заболеваний, таких как чумная, туляреминая и бруцеллезная¹⁴, общая концентрация взвеси микробных клеток определяется по ОСО мутности 10 МЕ и затем рассчитывается по формуле с использованием коэффициента концентрации соответствующего микроба, указанного в инструкции по применению ОСО мутности бактериальных взвесей. С 2015 г. коэффициент концентрации взвеси спор сибиреязвенного микроба представлен в инструкции по применению ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ и соответствует $0,11 \times 10^9$ спор/мл [17].

Это позволило нам показать возможность проведения испытания вакцины сибиреязвенной по показателю «Специфическая активность» методом подсчета общей концентрации спор по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, как это принято в испытаниях других бактериальных живых вакцин. На основании представленной в ОФС 1.7.2.0008.15¹⁵ формулы подсчета бактериальной концентрации по ОСО мутности нами предложена формула (2) подсчета общей концентрации (ОК) спор в вакцине сибиреязвенной:

$$OK = \frac{(0,1 + n) (0,1 \times 10^9)}{0,1}, \quad (2)$$

где 0,1 — количество восстановленной вакцины в мл; n — объем воды очищенной, использованной для разведения пробы до мутности 10 МЕ, мл; $(0,1 \times 10^9)$ — эквивалент концентрации спор/мл сибиреязвенного микроба по ОСО мутности.

Общая концентрация спор во всех образцах вакцины, определенная по ОСО мутности бактериальной взвеси 10 МЕ (табл. 2), составляет $(4,41 \pm 0,5) \times 10^9$ спор/мл, при этом количество живых спор в ней — $60 \pm 13\%$. Количество живых спор, определенных по ОСО мутности, было в пределах нормируемых показателей — не менее 40% от общей концентрации спор. Общая концентрация спор, определенная с помощью камеры Горяева, составила $(4,55 \pm 0,6) \times 10^9$ спор/мл, а процент живых спор — $45 \pm 12\%$. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что концентрации спор, определенные в камере Горяева и по ОСО мутности, сопоставимы. Это подтвердил проведенный статистический анализ с применением непараметрического U -критерия Манна — Уитни: достигнутый уровень значимости $P_{\text{эмп}}$ составил 0,5967 и значительно превышал принятый критический уровень значимости 0,05. Таким образом, общие концентрации спор сибирской язвы в вакцине, рассчитанные с использованием ОСО мутности, статистически не отличались от концентраций, рассчитанных с помощью камеры Горяева.

При этом необходимо отметить недостатки использования камеры Горяева для определения общей концентрации спор в вакцине: неравномерное распределение спор по квадратам камеры, затруднение подсчета из-за слипания спор.

На основании результатов анализа полученных данных считаем, что определение общей концентрации спор готовой лекарственной формы вакцины сибиреязвенной живой по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ является более удоб-

¹⁴ Фармакопейная статья 3.3.1.0022.15. Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0019.15. Вакцина туляреминая живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0011.15. Вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

¹⁵ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

ным, объективным и информативным методом по сравнению с подсчетом в камере Горяева. В связи с этим метод расчета общей концентрации спор сибиреязвенного микроба с помощью ОСО мутности может быть рекомендован к включению в НД на вакцину сибиреязвенную живую в качестве альтернативного.

Выводы

Теоретически и экспериментально обоснованы перспективные методы экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой.

1. Проведен анализ существующих методов экспресс-диагностики сибирской язвы. Показано, что иммунохроматографический метод является эффективным экспресс-методом для видоспецифического выявления спор *B. anthracis* в вакцине сибиреязвенной живой. Экспериментально доказана возможность применения набора «ИХ тест-система *B. anthracis*» на основе иммунохроматографического метода как альтернативного для оценки качества по показателю «Подлинность» вакцины сибиреязвенной живой. При проведении данного испытания рекомендуемые концентрации вакцины составляют 10^8 и 10^9 спор/мл.

2. Предложена методика определения и формула расчета общей концентрации спор в показателе качества «Специфическая активность» вакцины сибиреязвенной живой с применением ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ. Показаны преимущества предложенного метода по сравнению с методом подсчета спор в камере Горяева.

3. Считаем, что предложенные методики являются перспективными для экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой и могут быть рекомендованы для внесения в нормативную документацию на вакцину сибиреязвенную живую в качестве альтернативных. Для внесения соответствующих изменений в нормативную документацию на вакцину сибиреязвенную живую производительно необходимо провести валидацию представленных методик.

Вклад авторов. *И. В. Касина* — идея, концепция и дизайн исследования, теоретическое обоснование выбранных методов оценки качества, экспериментальная работа по определению общей концентрации спор по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ в вакцине сибиреязвенной живой, обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов, написание текста и критический пересмотр его содержания; *С. А. Алексеева* — экспериментальная работа по определению показателя качества «Подлинность» вакцины сибиреязвенной живой, анализ и интерпретация результатов исследования, статистическая обработка результатов, написание текста; *Т. И. Немировская* — корректировка текста статьи и окончательное утверждение версии статьи для публикации.

Authors' contributions. *Irina V. Kasina*—elaboration of the study idea, concept, and design, providing theoretical justification of the chosen quality control methods, determination of total spore concentration in live anthrax vaccine using the industry reference standard of bacterial suspension turbidity equivalent to 10 IU, summarising the experimental data, writing and revision of the text; *Svetlana A. Alekseeva*—performing the identification test for live anthrax vaccine, analysis, interpretation, and statistical processing of the study results, writing of the text; *Tatyana I. Nemirovskaya*—revision of the text, approval of the final version of the paper for publication.

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). Выражаем благодарность главному технологу ИЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России кандидату биологических наук Фадейкиной

Ольге Васильевне за оказанную помощь в статистической обработке результатов.

Acknowledgments. 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). The authors express their gratitude to Olga Fadeykina, Candidate of Biological Sciences, chief technologist of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products for her assistance in statistical processing of the study results.

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. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Шишкова НА, Герасимов ВН. Сибиреязвенные скотомогильники: проблемы и решения. М.: Династия; 2017. [Marinin LI, Dyatlov IA, Shishkova NA, Gerasimov VN. *Burial grounds of cattle that contain anthrax: problems and solution to them*. Moscow: Dynastiya; 2017 (In Russ.)]
2. Ковальчук НА. Сибиреязвенные скотомогильники: актуальные проблемы. *Известия Российской Военно-медицинской академии*. 2019;1(S1):214–6. [Kovalchuk NA. Siberian cattle burial grounds: actual problems. *Izvestiya Rossiyskoy Voенno-meditsinskoy akademii = Izvestia of the Russian Military Medical Academy*. 2019;1(S1):214–6 (In Russ.)]
3. Гаврилов ВА, Грязнева ТН, Селиверстов ВВ. Сибирская язва — вечная проблема землян. М.: ФГБОУ ВО МГБВМиБ — МВА им. К.И. Скрябина; 2017. [Gavrilov VA, Gryazneva TN, Seliverstov VV. *Anthrax — the eternal problem of earthlings*. Moscow: Moscow SAVMB; 2017 (In Russ.)]
4. Попова АЮ, Ежлова ЕБ, Демина ЮВ, Куличенко АН, Рязанова АГ, Буравцева НП и др. Пути совершенствования эпидемиологического надзора и контроля за сибирской язвой в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(1):84–8. [Popova AYU, Ezhlova EB, Demina YuV, Kulichenko AN, Ryazanova AG, Buravtseva NP, et al. Ways to improve the epidemiological surveillance and control of anthrax in the Russian Federation. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(1):84–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-1-84-88>
5. Ланцов ЕВ, Кобылкин ДВ, Кузин АА, Азаров ИИ, Аминов РМ. Роль и организация работы военных специалистов профилактического профиля при ликвидации последствий биолого-социальной чрезвычайной ситуации (на примере ликвидации очага сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г.). *Медицина катастроф*. 2017;(4):38–42. [Lantsov EV, Kobylkin DV, Kuzin AA, Azarov II, Aminev RM. Role and activity organization of military specialists of preventive measures line in liquidation of consequences of biological-social emergency situation (as exemplified by liquidation of anthrax focus in Yamalo-Nenets Autonomous okrug in 2016). *Meditsina katastrof = Disaster Medicine*. 2017;(4):38–42 (In Russ.)]
6. Супотницкий МВ. Биологическая война. Введение в эпидемиологию искусственных эпидемических процессов и биологических поражений. М.: Кафедра, Русская панорама; 2013. [Supotnitskiy MV. *Biological warfare. Introduction to the epidemiology of artificial epidemic processes and biological lesions*. Moscow: Kafedra, Russkaya panorama; 2013 (In Russ.)]
7. Шевцов АН, Коротышев ОВ, Пермяков СА, Погорельский ИП. Вакцинопрофилактика сибирской язвы в Российской Федерации и ее ближайшие перспективы. *Вестник войск РХБ защиты*. 2019;3(4):337–49. [Shevtsov AN,

- Korotyshev OV, Permyakov SA, Pogorelsky IP. Vaccinal prevention of anthrax in the Russian Federation and its immediate prospects. *Vestnik voysk RKKhB zashchity = Journal of NBC Protection Corps*. 2019;3(4):337–49 (In Russ.)
8. Волова ЛЮ. Организация вакцинопрофилактики против сибирской язвы в плановом порядке и по эпидемическим показаниям на территории Ямало-Ненецкого автономного округа. *Журнал МедиАль*. 2018;2:36–8. [Volova LYu. Organization of vaccination against anthrax in a planned manner and for epidemic indications in Yamalo-Nenets Autonomous district. *Zhurnal MediAl = MediAl*. 2018;2:36–8 (In Russ.)]
 9. Саяпина ЛВ, Бондарев ВП, Олефир ЮВ. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;2:107–10. [Sayarina LV, Bondarev VP, Olefir YuV. Current state of the vaccine prophylaxis of particularly dangerous infections. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;2:107–10 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-107-110>
 10. Мовсесянц АА, Миронов АН, Меркулов ВА, Борисевич ИВ. Цели и задачи Испытательного центра экспертизы качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2012;1:7–9. [Movsesyants AA, Mironov AN, Merkulov VA, Borisevich IV. Aims and objectives of the Testing center for quality expertise of medical immunobiological preparations. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2012;1:7–9 (In Russ.)]
 11. Мовсесянц АА, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Шимчук ЛФ. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;2:38–41. [Movsesyants AA, Bondarev VP, Olefir YuV, Merkulov VA, Shimchuk LF. Quality standards of immunobiological medicinal products — new texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;2:38–41 (In Russ.)]
 12. Поздеев О.К. *Медицинская микробиология*. М.: ГЭОТАР-МЭД; 2004. [Pozdeev OK. *Medical microbiology*. Moscow: GEOTAR-MED; 2004 (In Russ.)]
 13. Онищенко ГГ, Брагина ИВ, Ежлова ЕБ, Демина ЮВ, Пакскина НД, Шеенков НВ и др. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство*. М.: ЗАО «Шико», 2013. [Onishchenko GG, Bragina IV, Eglova EB, Demina YuV, Paskina ND, Sheenkov NV, et al. *Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases. Practical guide*. Moscow: ZAO "Shiko"; 2013 (In Russ.)]
 14. Соловьев ПВ, Баранова ЕВ, Федюкина ГН. Разработка и опытно-экспериментальное производство иммунохроматографических тест-систем для выявления и идентификации *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* и *L. monocytogenes*. В кн.: *Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских учреждений Роспотребнадзора «Биологическая безопасность в современном мире»*. 21–22 апреля 2009 г. п. Оболensk. Протвино; 2009. С. 140–2. [Soloviev PV, Baranova EV, Fedyukina GN. Development and experimental production of immunochromatographic test systems for the detection and identification of *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* and *L. monocytogenes*. In: *Proceedings of the scientific and practical conference of young scientists and specialists of research institutions of Rosпотребнадзор «Biological safety in the modern world»*. April 21–22, 2009, Obolensk. Protvino; 2009. P. 140–2 (In Russ.)]
 15. Кравец ЕВ, Дугаржапова ЗФ, Родзиковский АВ, Хлынцева АЕ, Лулева НМ, Белова ЕВ и др. Применение методов латекс-агглютинации и иммунохроматографии для ускоренной идентификации культур *Bacillus anthracis* при эпидемиологических расследованиях вспышек. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011;1:81–2. [Kravets EV, Dugarzhapova ZF, Rodzиковский AV, Khlyntseva AE, Luneva NM, Belova EV, et al. Application of latex agglutination and immune chromatography methods for rapid identification of *Bacillus anthracis* cultures in the epidemiological investigation of outbreaks. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2011;1:81–2 (In Russ.)] [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-1\(107\)-81-82](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-1(107)-81-82)
 16. Егорова ИЮ, Селянинов ЮО, Ковалева ЕН. Оценка эффективности и практической пригодности современных методов экспресс-индикации возбудителя сибирской язвы. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016;2:3–13. [Egorova IY, Selyaninov YO, Kovaleva EN. Evaluation of effectiveness and feasibility of up-to-date methods for anthrax rapid indication. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016;2:3–13 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18551/rjoas.2016-02.01>
 17. Фадейкина ОВ, Касина ИВ, Алексеева СА, Ковтун ВП, Бурдина ЕН, Ермолаева ТН и др. Применение отраслевого стандартного образца мутности бактериальных взвесей для определения общей концентрации микробных клеток в суспензиях сибиреязвенного, чумного и бруцеллезного микробов. *Успехи современного естествознания*. 2015;(1–8):1287–90. [Fadeykina OV, Kasina IV, Alekseeva SA, Kovtun VP, Burdina EN, Ermolaeva TN, et al. Application of branch standard sample of bacterial suspension opacity for microbial cells total concentration determination in suspension of anthrax, plague and brucellosis bacteria. *Uspekhi sovremennoego estestvoznaniya = Advances in Current Natural Sciences*. 2015;(1–8):1287–90 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Касина Ирина Владимировна, канд. биол. наук. *Irina V. Kasina*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2002-0151>

Алексеева Светлана Александровна, канд. биол. наук. *Svetlana A. Alekseeva*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5804-5709>

Немировская Татьяна Ивановна, канд. мед. наук. *Tatyana I. Nemirovskaya*, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0848-7306>

Поступила 22.07.2020
После доработки 06.11.2020
Принята к публикации 04.12.2020

Received 22 July 2020
Revised 6 November 2020
Accepted 4 December 2020

Научно-практическая конференция

«Современные подходы к экспертизе лекарственных средств»

(RegLek 2020)

Applied Research Conference

“Current Approaches to Evaluation of Medicinal Products”

(RegLek 2020)



Ю. В. Олефир, и. о. генерального директора ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

«Реально понимая значимость появления препаратов отечественных производителей для нашего здравоохранения, разрешение на проведение клинических исследований выдавали за 4–6 дней!» (Ю. В. Олефир)¹

В период с 24 по 27 ноября 2020 г. в онлайн-формате состоялась научно-практическая конференция «Современные подходы к экспертизе лекарственных средств» (RegLek 2020). Конференция RegLek 2020 в очередной раз объединила руководителей регуляторных и надзорных органов, ведущих экспертов, представителей отрасли и отраслевых ассоциаций с целью обсуждения ключевых вопросов и путей их решения.

Пленарное заседание конференции проводилось с участием директора Департамента технического регулирования и аккредитации Евразийской экономической комиссии Т.Б. Нурашаева, директора департамента государственного регулирования обращения лекарственных средств Минздрава России Ф.А. Романова, и. о. генерального директора ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Ю. В. Олефира, директо-

ра ФБУ «ГИЛС и НП» Минпромторга России В. Н. Шестакова. На пленарном заседании были обозначены основные направления работы и актуальные вопросы конференции.

Секционные заседания конференции проводились в 4 сессии. После окончания каждого секционного заседания было предусмотрено дополнительное время для проведения дискуссии.

На секционном заседании, посвященном вопросам экспертизы и регистрации биотехнологических лекарственных препаратов (БЛП), выступили сотрудники ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России: главный эксперт Управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Ж. И. Авдеева, начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП Р. А. Волкова, начальник лаборатории биохимии Испытательного центра экспертизы качества МИБП О. Б. Устинникова, а также представитель биотехнологической компании Amgen (США), ведущий менеджер отдела разработки производственных процессов О. А. Симакова.

Ж. И. Авдеева в докладе «Особенности экспертизы и контроля качества биотехнологических лекарственных препаратов в соответствии с современными требованиями: проблемы безопасности» отметила, что качество БЛП обеспечивается в первую очередь условиями их производства. Принципы исследования БЛП существенно отличаются от таковых для препаратов химического синтеза, учитывая белковую природу, длительность применения и уникальные особенности. На примере лекарственных препаратов МкАТ представлены основные принципы проведения исследований БЛП. Отмечено, что существуют проблемы, связанные с безопасностью применения, в частности с риском развития побочных реакций, обусловленных проявлением «нежелательной» иммуногенности. Подчеркнуто, что только результаты клинических исследований позволяют оценить истинный иммуногенный потенциал препарата. После регистрации препарата, как правило, требуется дальнейшая оценка иммуногенности, которую необходимо предусмотреть в рамках фармаконадзора.

В докладе «Валидация методик испытаний биотехнологических лекарственных препаратов» Р. А. Волкова отметила, что подходы к валидации методик испытаний БЛП зависят от их назначения и особенностей. Были обозначены основные положения, которые необходимо учитывать в протоколе валидации количественных биологических методик, отмечено значение оценки качества ключевых реагентов и устойчивости методики, которую целесообразно проводить на этапе ее разработки. Для БЛП особенно важно определение биологической активности препарата и, соответственно, адекватный выбор стандартного образца. Рассмотрены общие принципы валидации методик обнаружения нейтрализующих антител, особенности валидации методик на основе ПЦР, примеры оценки устойчивости.

¹ https://www.regmed.ru/Content/News/PR20201201_RegLek-2020_Expertise_issues

Типичные ошибки, которые выявляются в ходе экспертизы на БЛП, подробно были рассмотрены в докладе О. Б. Устинниковой. Докладчик подчеркнула необходимость представления в материалах регистрационного досье на БЛП (в том числе в нормативной документации) данных, подтверждающих структуру молекулы рекомбинантного терапевтического белка на уровне первичной последовательности и значимых пост-трансляционных модификаций, а также данных, подтверждающих структуру конъюгата для соответствующих молекул. Также были даны основные рекомендации по структуре разделов нормативной документации, указаны типичные ошибки, допускаемые при изложении методик, и обозначены основные рекомендации по их устранению.

Круглый стол по актуальным вопросам экспертизы лекарственных средств по правилам ЕАЭС завершил научно-практическую конференцию. На все вопросы, поступавшие от участников конференции в режиме онлайн, отвечали директор Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Д. В. Горячев, заместитель директора Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Е. Л. Ковалева, начальник контрольно-организационного Управления ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Е. М. Рычихина.

Информация о конференции RegLek 2020 представлена на сайте <http://www.fru.ru/>. Материалы публикуются с разрешения организатора конференции.



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) — T57941



ISSN 2221-996X



9 772221 996004