

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

БЕЛЯКОВА ОЛЬГА ВАЛЕРЬЕВНА

**РАЗРАБОТКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ФОРМЫ
ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ
HAEMOPHILUS INFLUENZAE ТИП *B*, В СОСТАВЕ КОМБИНИРОВАННЫХ
ВАКЦИН**

14.04.01 – Технология получения лекарств

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Николаева А.М.

Пермь - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Характеристика возбудителя, клинические формы и эпидемиологические особенности Нib-инфекции.....	15
1.2. История создания и характеристика вакцин, применяющихся для профилактики Нib-инфекции	18
1.3. Производство конъюгированных Нib-вакцин	20
1.3.1. Известные способы получения активных фармацевтических субстанций для производства конъюгированных Нib-вакцин	20
1.3.2. Контроль качества конъюгированных Нib-вакцин.....	24
1.4. Вакцины для профилактики Нib-инфекции.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	42
2.1. Объект исследования.....	42
2.2. Материалы.....	42
2.2.1. Препараты сравнения.....	43
2.2.2. Иммуноферментные тест-системы.....	43
2.2. Оборудование.....	44
2.3. Лабораторные животные.....	45
2.4. Методы.....	46
2.4.1. Фармакопейные методы анализа.....	46
2.4.2. Физико-химические методы анализа	48
2.4.3. Иммунохимические и иммунобиологические методы анализа	52
2.4.4. Технологические методы.....	56
2.4.5. Проведение валидации аналитических методик.....	57
2.4.6. Методы изучения общетоксических свойств.....	58
2.5. Методы статистической обработки результатов исследования	61
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ПОЛИРИБОЗИЛРИБИТОЛА ФОСФАТА, КОНЪЮГИРОВАННОГО С БЕЛКОМ-НОСИТЕЛЕМ СТОЛЬНЯЧНЫМ АНАТОКСИНОМ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ	62
3.1. Разработка методики анализа субстанции Нib по показателю «Посторонние примеси» и ее валидация.....	62
3.2. Разработка методики анализа субстанции Нib по показателю «Распределение по размеру молекулы» и ее валидация	76

3.3. Характеристика субстанции Нib по показателям «Содержание полирибозилрибитола фосфата» и «Содержание свободного полирибозилрибитола фосфата»	83
3.4. Характеристика субстанции Нib по показателям «Белок» и «Соотношение полисахарид : столбнячный анатоксин».....	88
3.5. Характеристика субстанции Нib по показателю «Остаточные функциональные группы»	89
3.6. Характеристика субстанции Нib по показателю «Подлинность»	92
3.7. Характеристика субстанции Нib с помощью фармакопейных методов	94
ГЛАВА 4. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ	
ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ФОРМЫ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ	
ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ НАЕМОРИLUS INFLUENZAЕ ТИП В	
4.1. Разработка варианта защитной среды для лиофилизации Нib-вакцины	99
4.2. Отработка режима лиофильного высушивания Нib-вакцины	105
4.3. Разработка методики анализа готовой лекарственной формы Нib-вакцины по показателю «Специфическая активность» и ее валидация	109
4.4. Определение содержания конъюгированного столбнячного анатоксина (белок) в Нib-вакцине	115
4.5. Определение подлинности Нib-вакцины	116
4.6. Определение иммуногенности Нib-вакцины	118
4.7. Изучение специфической безопасности Нib-вакцины	120
4.8. Характеристика готовой лекарственной формы Нib-вакцины с помощью фармакопейных методов	121
4.9. Исследование стабильности Нib-вакцины при хранении.....	123
ГЛАВА 5. ЛАБОРАТОРНО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	
БЕЗОПАСНОСТИ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ СИНТЕТИЧЕСКОЙ	
КОНЪЮГИРОВАННОЙ НIB-ВАКЦИНЫ	
5.1. Изучение «острой» и «хронической» токсичности Нib-вакцины	132
5.2. Изучение местного раздражающего действия Нib-вакцины	138
ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВКЛЮЧЕНИЯ	
ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО НIB-КОМПОНЕНТА В СОСТАВ	
КОМБИНИРОВАННЫХ ВАКЦИН	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	149
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	151
ПРИЛОЖЕНИЕ А	175
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	177
ПРИЛОЖЕНИЕ В	182

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Нib-вакцина	вакцина для профилактики инфекции, вызываемой <i>Haemophilus influenzae</i> тип <i>b</i> , конъюгированная синтетическая
Нib-субстанция	вакцина для профилактики инфекции, вызываемой <i>Haemophilus influenzae</i> тип <i>b</i> , конъюгированная синтетическая, субстанция
PRP	полирибозилрибитола фосфат
АКДС	вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная жидкая
АКДС-ГепВ	вакцина для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В адсорбированная жидкая
аАКДС	вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная жидкая с ацеллюлярным коклюшным компонентом
аАКДС-ГепВ+Нib	вакцина против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша бесклеточная адсорбированная, инфекции, вызываемой <i>Haemophilus influenzae</i> тип <i>b</i> , конъюгированная синтетическая
АКДС-ГепВ+Нib	вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В адсорбированная, инфекции, вызываемой <i>Haemophilus influenzae</i> тип <i>b</i> , конъюгированная синтетическая
ИПВ	инактивированная полиомиелитная вакцина
НД	нормативная документация
ОПР	опытно-промышленный регламент
ЕФ	Европейская Фармакопея
ГФ	Государственная Фармакопея
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ-ВЭЖХ	гель фильтрационная высокоэффективная жидкостная хроматография
ОФ-ВЭЖХ	обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
MALLS- детектирование	детектирование рассеиванием лазерного излучения с кратными углами
MS- детектирование	масс-спектроскопическое детектирование
ЯМР	ядерно-магнитный резонанс
ПДК	предельно допустимая концентрация
ПФ	подвижная фаза
LOD	предел детектирования
ОП	оптическая плотность
ИФА	иммуноферментный анализ
МЕ	международные единицы
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
CuЭДТА	комплекс натриевой соли диаминтетрауксусной кислоты с катионами меди
DMCO	диметилсульфоксид
НЭМ	N-этилмалеимид
ДТТ	дитиотреитол
РКОА	реакция коаггутинации
АС	анатоксин столбнячный
ДС	диагностикум столбнячный
OMP	белок внешней мембраны <i>Neisseria meningitidis</i> группы В
CRM 197	белок, рекомбинантный нетоксичный вариант дифтерийного токсина

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Инфекция, вызываемая *Haemophilus influenzae* тип *b* (Ніb-инфекция), обуславливает такие тяжелые инвазивные заболевания, как менингит (воспаление оболочек головного и спинного мозга), сепсис (проникновение бактерий в кровеносное русло), эпиглоттит (воспаление надгортанника) и пневмония (воспаление легких). Наиболее значимые проявления гемофильной инфекции отмечаются в основном среди детей младше 2 лет (особенно детей первого года жизни) [10, 22, 54, 78].

С учетом практической значимости Ніb-инфекции, высокой частоты бактерионосительства, увеличения резистентности Ніb к антибиотикам, наличия осложненных форм заболевания и высокой летальности, очевидна медицинская и экономическая целесообразность профилактики этой инфекции. Единственным надежным средством профилактики заболевания является активная иммунизация [22, 131].

Создание конъюгированной вакцины для профилактики Ніb-инфекции (Ніb-вакцины) позволило предупреждать инвазивную Ніb-инфекцию, начиная с самого раннего возраста, в котором она наносит максимальный урон [75, 143, 191]. Конъюгированные Ніb-вакцины представляют собой полисахарид капсулы Ніb (полирибозилрибитола фосфат (PRP), являющийся основным антигеном), ковалентно связанный с белковым носителем. Белково-полисахаридный комплекс распознается макрофагами и Т-лимфоцитами, индуцируя Т-зависимый иммунный ответ у детей первых лет жизни, благодаря которому формируется высокий титр специфических антител [53, 66, 70, 113, 155].

В настоящее время в мировой медицинской практике имеется несколько десятков вакцинных препаратов для профилактики Ніb-инфекции, среди них как моно, так и комбинированные вакцины. При этом Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует проводить вакцинацию

детей раннего возраста против Hib-инфекции совместно с вакцинацией против дифтерии, столбняка и коклюша, гепатита В и полиомиелита [22].

Включение новых антигенов в существующие комбинированные вакцины позволяет не только уменьшить стрессовую нагрузку на прививаемых, но и более успешно реализовать проведение вакцинации в сроки, определенные календарем прививок, снизить загруженность медицинских работников и соответственно уменьшить стоимость программ иммунизации [34, 124].

Однако разработка подобных комбинированных вакцин является сложной задачей. Вновь разработанные комбинированные препараты не должны быть менее иммуногены, менее эффективны или более реактогенны, чем зарегистрированные ранее моновакцины. Иммунологические, физические или химические взаимодействия компонентов в сложной матрице антигенов, адъювантов и вспомогательных веществ могут влиять на иммунный ответ на специфические антигены [81].

Особо следует отметить сниженный иммунный ответ на Hib антиген, связанный с несовместимостью с адъювантом алюминия гидроксидом. Гидролитическое расщепление скелета PRP, катализируемое гидроксидом алюминия, который широко используется для повышения иммуногенности вакцин против дифтерии, столбняка и коклюша (АКДС), приводит к высвобождению свободного полисахарида и как следствие снижению иммуногенности Hib-вакцины [78, 111, 172].

Кроме того, снижение эффективности конъюгированной Hib-вакцины часто наблюдается при применении комбинированных вакцин, содержащих бесклеточный коклюшный компонент (аАКДС) [85-87, 118, 161, 175, 176]. Поэтому в процессе включения новых антигенов в существующие комбинированные препараты важным моментом становится изучение совместимости и конкурентности компонентов в составе комбинированных вакцин, а также доказательство того, что новая комбинация не снижает иммунологической эффективности отдельных антигенов.

В связи с этим многие производители выпускают Hib-компонент комбинированных вакцин в лиофилизированной форме, растворителем для которого служат суспензии АКДС (в различных комбинациях с инактивированной полиомиелитной вакциной и вакциной против гепатита В). Это позволяет сократить контакт Hib антигена с алюминиевым адьювантом, сохранить присущие активному компоненту иммунологические свойства и повысить стабильность вакцины в процессе хранения [25, 33, 135, 144, 178, 189].

В филиале АО НПО «Микроген» в г. Перми «Пермское НПО «Биомед» уже много лет выпускаются комбинированные вакцины АКДС и АКДС-Геп В, которые широко применяются для вакцинации детей раннего возраста в России. Разработка и регистрация субстанции бесклеточной коклюшной вакцины послужила началом созданию более современных конкурентоспособных отечественных поливалентных вакцин. Следующим этапом является модифицирование комбинированных вакцин путем включения антигена против Hib-инфекции. Можно смело утверждать, что будущее стоит именно за этими препаратами [34].

Степень разработанности темы диссертации

В настоящее время во всем мире для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В, полиомиелита и Hib-инфекции применяют комбинированные вакцины, перечень которых весьма широк, а эффективность доказана в многочисленных исследованиях [19, 146, 173]. Из них в России применяются Инфанрикс-Гекса® («GlaxoSmithKline», Бельгия) и Пентаксим® («Sanofi Pasteur», Франция). При этом перечень отечественных препаратов весьма ограничен: АКДС, АКДС-ГепВ и Бубо-Кок. Отечественные комбинированные вакцины не содержат компонента против Hib-инфекции.

Цель и задачи исследования

Целью исследования является разработка лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae*

тип *b*, на основе активной фармацевтической субстанции синтетического полирибозилрибитола фосфата, конъюгированного со столбнячным анатоксином, для конструирования комбинированных вакцин.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Оценить качество активной фармацевтической субстанции синтетического полирибозилрибитола фосфата, конъюгированного со столбнячным анатоксином (субстанции Hib), в соответствии с требованиями, предъявляемыми Европейской Фармакопеей 8 издания к субстанциям конъюгированных вакцин для профилактики Hib-инфекции. Установить нормы качества и разработать спецификацию субстанции Hib.

2. Разработать и стандартизировать технологию получения лиофилизированной формы синтетической Hib-вакцины.

3. Установить нормы качества и разработать спецификацию лиофилизированной формы Hib-вакцины.

4. Изучить токсическое действие полученной лиофилизированной формы Hib-вакцины в опытах на животных.

5. Экспериментально обосновать конструкции комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и Hib-инфекции.

6. Разработать проект нормативной документации на лиофилизированную Hib-вакцину для включения в опытно-промышленные регламенты на комбинированные вакцины АКДС-ГепВ+Hib и аАКДС-ГепВ+Hib.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили труды как отечественных, так и зарубежных авторов в области производства лиофилизированных биофармацевтических препаратов и комбинированных вакцин. В диссертационном исследовании также использовались нормативные документы России, Европейского Союза и ВОЗ, касающиеся

производства и контроля вакцинных препаратов, валидации аналитических методов исследования и проведения доклинических исследований новых лекарственных средств. Наряду с библиографическими, в работе были использованы аналитические и статистические методы исследования. В зависимости от поставленной цели и задач данные методы применялись на разных этапах исследования.

Научная новизна

Впервые разработан оригинальный способ определения примесей этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), диметилсульфоксида (ДМСО) и N-этилмалеимида (НЭМ) методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) в фармацевтических субстанциях (Пат. № 2621645).

Впервые разработан состав и технология получения лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b* (Ніb-вакцина), на основе субстанции синтетического полирибозилрибитола фосфата, конъюгированного со столбнячным анатоксином. Разработанная лиофилизированная форма Ніb-вакцины соответствует требованиям действующих международных и отечественных нормативных документов, предъявляемым к препаратам такого класса.

Показана безопасность и высокая иммунологическая активность лиофилизированной Ніb-вакцины. Продемонстрирована полная иммунологическая совместимость дифтерийного, столбнячного, коклюшного, гепатитного и гемофильного компонентов в составе поливалентных вакцин АКДС-ГепВ+Ніb, аАКДС-ГепВ+Ніb, что обосновывает включение лиофилизированной Ніb-вакцины в конструкции комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша и гепатита В.

Впервые установлено, что иммуногенность Ніb-компонента в составе комбинированных вакцин, содержащих как цельноклеточный, так и бесклеточный коклюшный компонент, значительно выше, чем в виде

моновакцины, что свидетельствует о потенцирующем эффекте, наблюдаемом при совместном введении антигенов в одном препарате.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в обосновании и разработке научно-методических подходов к созданию комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и гемофильной инфекции тип b.

Практическая значимость работы заключается в разработке технологии лиофилизированной Hib-вакцины на основе субстанции синтетического полирибозилрибитола фосфата, конъюгированного со столбнячным анатоксином.

Разработанная технология апробирована в цехе вакцинно-сывороточных препаратов филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» (акт внедрения от 13.02.2018). Изготовлены три экспериментально-производственные серии лиофилизированной Hib вакцины, которые были включены в состав комбинированных вакцин АКДС-ГепВ+Hib и аАКДС-ГепВ+Hib (по три серии каждой вакцины).

На основании проведенных исследований разработаны:

7. Проекты нормативной документации (НД) «Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b, конъюгированная синтетическая (Вакцина АКДС-Геп В+Hib)» и «Вакцина против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша бесклеточная адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b, конъюгированная синтетическая (Вакцина аАКДС-ГепВ+Hib)».

8. Проекты опытно-промышленных регламентов (ОПР) на комбинированные вакцины АКДС-ГепВ+Hib и аАКДС-ГепВ+Hib.

По результатам клинических испытаний комбинированные вакцины АКДС-ГепВ+Hib и аАКДС-ГепВ+Hib рекомендованы для регистрации на

территории Российской Федерации для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и Ніb-инфекции у детей.

Положения, выносимые на защиту

1. Обоснование выбора показателей качества и результаты валидации методов контроля субстанции Ніb, спецификация.
2. Состав и технология получения лиофилизированной синтетической Ніb-вакцины.
3. Обоснование выбора показателей качества и результаты валидации методов контроля лиофилизированной синтетической Ніb-вакцины, спецификация. Результаты изучения физико-химических свойств и иммуногенности лиофилизированной Ніb-вакцины.
4. Результаты изучения острой и хронической токсичности, местного раздражающего действия и специфической безопасности лиофилизированной Ніb-вакцины.
5. Использование лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, в составе комбинированных вакцин.

Степень достоверности и апробация работы

Научные положения и выводы базируются на большом объеме проведенных исследований, выполненных с использованием современных методов анализа и последующей статистической обработкой результатов исследования.

Материалы проведенных исследований были доложены и обсуждены на XX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва, 2013; V Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням Москва, 2013; Российском научном форуме на Урале с международным участием «Актуальные вопросы фундаментальной медицины», Екатеринбург, 2014; Научно-практической конференции памяти профессора А.В. Казьянина, Пермь, 2014, 2015; Всероссийской научно-практической

конференции, посвященной 120-летию филиала АО НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермского НПО «Биомед» (г. Пермь, 14-15 июня 2018 г.).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации» (№ 01.9.50007417).

Публикации материалов исследования

По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 4 из них в изданиях, рекомендованных ВАК, получен 1 патент на изобретение.

Личный вклад автора

Данные, приведенные в диссертации, получены при непосредственном участии автора на всех этапах планирования и проведения экспериментальных исследований на базе ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России и филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», статистической обработки полученных результатов, оформление НД и ОПР.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 - технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3, 7 паспорта специальности – технология получения лекарств.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 185 страницах машинописного текста, иллюстрирована 66 таблицами и 21 рисунком, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав экспериментальных исследований, заключения, списка литературы,

включающего 191 источника, из них 56 отечественных и 135 иностранных авторов, приложений на 11 страницах.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика возбудителя, клинические формы и эпидемиологические особенности *Hib*-инфекции

Бактериальные инфекции являются ведущими причинами заболеваемости и смертности детей раннего возраста. По данным ВОЗ одной из таких инфекций является гемофильная инфекция тип b [17].

Возбудителем гемофильной инфекции является бактерия *Haemophilus influenzae*. Впервые она была обнаружена в 1883 году Робертом Кохом [140]. В ходе пандемии гриппа 1889 года, Роберт Пфайфер изолировал *H. Influenzae* (которую он назвал «Палочка Пфайфера») от больного, умершего от пневмонии, и описал ее как возбудителя гриппа [154]. Мнение, что этот микроорганизм может вызывать грипп, сохранялось до выяснения вирусной природы гриппа. Бактерия приобрела свое название в 1920 г. благодаря тому, что она способна расти только в присутствии содержащихся в эритроцитах факторов - никотинамидадениндинуклеотид и гемин [18, 20, 174].

Haemophilus influenzae это маленькая (1×0,3 мкм) грамотрицательная неподвижная неспорообразующая палочка (или коккобацилла) из семейства *Pasteurellaceae*, которая существует в капсулированной и некапсулированной форме. Среди капсулированных штаммов выделяют 6 серотипов (от a до f), отличающихся химическим строением полисахарида, образующего капсулу [186]. Наличие капсулы имеет большое клиническое значение, так как она является основным фактором вирулентности этого микроорганизма.

Высокая патогенность капсулированных штаммов *H. Influenzae* серотипа b (*Hib*) в сравнении с другими серотипами капсулированных штаммов *H. Influenzae* была предметом напряженных исследований. [138, 148, 149, 167]. Поверхность *Hib* состоит из клеточной стенки и полисахаридной капсулы. Капсула *Hib* состоит из повторяющихся полимеров рибозил и рибитолфосфата. Капсулы других серотипов *H. Influenzae* состоят из гексоз, и очень редко вызывают инвазивные заболевания, хотя причина

различной патогенности серотипов *H. Influenzae* еще до конца не установлена [186]. Известно, что при инфицировании *Hib* в организме вырабатываются антитела к PRP, которые обеспечивают защиту организма от заболевания.

Являясь обычным представителем микрофлоры слизистой оболочки верхних дыхательных путей человека, гемофильная палочка может до 6 месяцев существовать в организме человека, не вызывая клинических симптомов. Распространенность носительства *Hib* у детей варьирует от 1 до 10% в различных странах и зависит от возраста, географического местоположения, плотности населения и охвата прививками [32, 68, 163].

Сравнительно редко инфицирование *Hib* приводит к развитию клинических форм заболевания, спектр которых весьма широк. Среди них преобладают менингит, пневмония, эпиглоттит, септический артрит (инфекционное поражение суставов), орбитальный целлюлит (воспаление тканей глаза позади орбитальной перегородки), остеомиелит (гнойно-некротический процесс, развивающийся в кости и костном мозге, а также в окружающих их мягких тканях) [68].

Инвазивные заболевания (при которых возбудителя обнаруживают в стерильных жидкостях и тканях организма), вызываемые *Hib*, могут возникать в любой возрастной группе, но преимущественно они считаются болезнями раннего детства. Пик заболеваемости приходится на детей в возрасте от 6 месяцев до 2 лет и редко наблюдается у детей до 2 месяцев и старше 6 лет. Такая возрастная зависимость объясняется тем, что у детей до 6 месяцев сохраняются материнские антитела, играющие защитную роль. Затем они исчезают, а собственные антитела вырабатываются в значимом количестве между 2 и 5 годами [20].

К 5 годам благодаря встрече с *Hib* (в основном при бактерионосительстве) большинство детей имеют антикапсульные антитела и антитела к другим антигенам бактерии. Хотя минимальный защитный уровень антител к капсульному полисахариду не установлен, предполагают, что их концентрация 0,15-1,0 мкг/мл коррелирует со снижением вероятности

заболевания, а при концентрации выше 1,0 мкг/мл защита сохраняется на протяжении как минимум года.

В результате многочисленных исследований, проведенных с 1950 по 2000 годы во всех частях света, было установлено, что ежегодно *Hib* вызывает около 8,13 миллионов случаев серьезных заболеваний и 371 тысячу случаев с летальным исходом среди детей в возрасте от 1 месяца до 5 лет [74, 112].

Наиболее тяжелая по клиническому течению и наиболее исследованная форма *Hib*-инфекции - гнойный бактериальный менингит, который составляет более 50% случаев среди инвазивных форм *Hib*-инфекции (рис. 1). Даже при раннем выявлении и адекватном лечении летальность при *Hib*-менингите равна 3-10%; у 15-30% переболевших длительно сохраняются нарушения в ЦНС, приводящие к потере трудоспособности (потеря слуха, нарушение развития речи, двигательные нарушения).

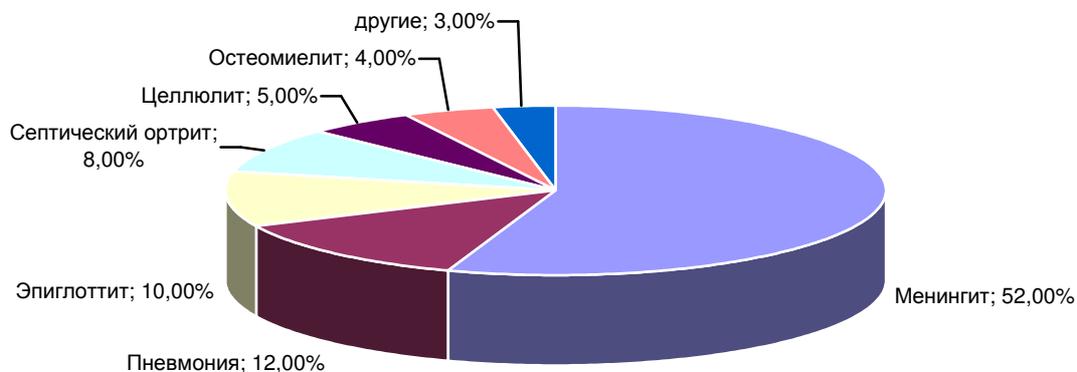


Рис. 1. Процентное распределение клинических проявлений *Hib*-инфекции [153].

В России исследование по заболеваемости *Hib*-инфекцией проводилось при содействии благотворительного фонда Вишневецкой – Ростроповича «Во имя здоровья и будущего детей» [54]. Исследование проводилось в ограниченном числе регионов, а именно в Москве, Ярославле, Казани, Екатеринбурге, Тюмени, Мурманске, Туле, Нижнем Новгороде,

Новосибирске, а также в Иркутске, Улан-Удэ, Якутске и Владивостоке [28, 35].

По расчетным данным число случаев *Hib*-менингита в целом по России в год составляет не меньше 300 и не превышает 1200, заболеваемость *Hib*-пневмонией составляет не менее 150 на 100 тыс. детей младше 5 лет и около 80 случаев в год с летальным исходом от *Hib*-инфекции. Таким образом, в современных российских условиях *Hib*-инфекция занимает одно из первых мест среди причин смерти детей (до 17 лет) от инфекционных заболеваний, уступая только туберкулезу, ВИЧ инфекции, менингококковой инфекции, острым кишечным инфекциям и вирусным гепатитам [35].

Вследствие высокой циркуляции штаммов *Hib* резистентных к антибиотикам не удается добиться 100% излечения заболевших даже при применении самых современных препаратов [20, 96, 114]. Именно поэтому для профилактики *Hib*-инфекции были созданы вакцины, позволяющие предотвратить развитие инвазивных форм заболеваний, а возможно, даже элиминировать *Hib*-инфекцию.

1.2. История создания и характеристика вакцин, применяющихся для профилактики *Hib*-инфекции

Наблюдение, что низкий уровень заболеваемости *Hib* инфекцией среди детей старшего возраста и взрослых связан с наличием в их сыворотке бактериальных антител к капсульному полисахариду *Hib* (PRP), привело к разработке вакцин на его основе.

Первая вакцина для профилактики *Hib*-инфекции была создана в 1970-х годах. Она представляла собой очищенный капсульный полисахарид *Hib*. На практике вакцина оказалась эффективной у взрослых и детей старшего возраста, но малоэффективной у новорожденных и детей раннего возраста [152, 157, 159, 165].

Низкая эффективность полисахаридной вакцины у детей младше 2-х лет связана с тем, что бактериальные полисахаридные антигены относятся к

разряду Т-независимых и вызывают образование антител преимущественно класса IgM. При таком механизме иммунного ответа выработанная защита не долговременна и не способствует развитию иммунологической памяти [53, 66, 70].

В 1931 г Айвери и Гобелем был впервые открыт способ повышения иммуногенности полисахаридов, заключающийся в ковалентном присоединении полисахарида к подходящему белку-носителю с образованием конъюгата [78, 155].

Конъюгированный антиген хорошо распознается иммунной системой младенца и стимулирует высокий антительный ответ. Индукция Т-зависимого пути позволяет также выработать быстрый и эффективный иммунный ответ в случаях контакта с инфекционными агентами [53, 66, 70, 113, 155]. Дополнительными преимуществами конъюгированных вакцин является создание «коллективного» иммунитета при проведении массовой вакцинации детей раннего возраста и борьба с назофарингеальным носительством и антибиотикорезистентностью [96, 131].

Первой конъюгированной вакциной для профилактики Hib-инфекции была вакцина ProHibiT¹, в качестве белка-носителя в которой использовался дифтерийный анатоксин (PRP-D). Вскоре были выпущены вакцины и с другими белками-носителями: рекомбинантным нетоксичным вариантом дифтерийного токсина, (белок CRM 197, PRP-CRM197 или HbOC; Vaxem Hib), белком внешней мембраны *Neisseria meningitidis* группы B (PRP-OMP; PedvaxHib) и столбнячным анатоксином (PRP-T; Акт-ХИБ®, Хиберикс®, Кими-Хиб®) [45, 103, 104, 155, 169].

При конструировании таких сложных с точки зрения химического строения иммунобиологических препаратов, как конъюгированные вакцины

¹ProHibiT (CONNAUGHT LABORATORIES, США) – конъюгированная вакцина для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* тип b, представляет собой капсульный полисахарид Hib ковалентно связанный с дифтерийным анатоксином (PRP-D). Одна доза (0,5 мл) содержит 25 мкг PRP, 18 мкг дифтерийного анатоксина и тиомерсал в качестве консерванта. Лекарственная форма – лиофилизат в комплекте с растворителем – фосфатно-солевым буферным раствором.

первостепенное значение имеет постоянство процесса производства и прогнозируемость их свойств [104].

1.3. Производство конъюгированных Нib-вакцин

В основном процессы изготовления конъюгированных вакцин для профилактики Нib-инфекции отличаются следующим: выбором белка-носителя, размером полисахарида, связующей молекулой, принципом химического процесса и способом удаления несвязанного PRP и других реагентов [139].

Производство конъюгированных вакцин включает в себя стадии получения иммуногенного конъюгата (приготовление антигена и белка-носителя, их активация и последующее связывание) и готовой лекарственной формы (жидкой или лиофилизированной), сопровождающиеся проведением контрольных процедур, позволяющих дать всестороннюю характеристику полуфабрикатов и готовой вакцины [104].

1.3.1. Известные способы получения активных фармацевтических субстанций для производства конъюгированных Нib-вакцин

Основной антиген Нib представляет собой полисахарид, состоящий из повторяющихся единиц рибозилрибитола, связанных друг с другом фосфодиэфирной связью, и соответственно именуется полирибозилрибитола фосфат (PRP) (рис.2).

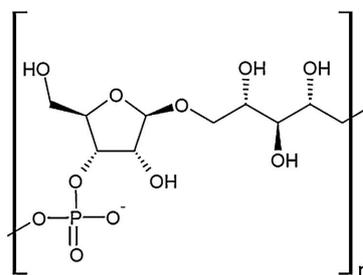


Рис. 2. Структура повторяющейся единицы капсульного полисахарида Нib.

Большинство конъюгированных Нib-вакцин изготавливаются из полисахарида, выделенного из бактериальных культур [129, 130]. Процесс

получения капсульного полисахарида Hib включает в себя культивирование микроорганизмов с подпиткой субстратом, очистку методом ультрафильтрации, спиртовое осаждение и ферментативный гидролиз [80].

Для производства конъюгированных вакцин может использоваться не только нативный высокомолекулярный полисахарид капсулы Hib, но так же частично уменьшенный в размере полисахарид или олигосахарид, состоящий из нескольких повторяющихся единиц. Сахаридный антиген перед проведением конъюгации активируют или подвергают фрагментации для образования активных функциональных групп на обоих концах цепи или на одном из них. Белок-носитель также может быть активирован перед связыванием с помощью введения активных функциональных групп, таких как тиольная или гидразидная. В некоторых случаях белок носитель используется в реакции конъюгирования без предварительной обработки.

Существует три принципиально различных технологии получения конъюгированных Hib-вакцин. Первые конъюгированные вакцины против Hib-инфекции были зарегистрированы в конце 1980-х и являлись результатом научной работы Портера Андерсона и его коллег. Данный подход включал активирование полисахарида методом периодатного окисления, с образованием олигосахаридов с активными альдегидными группами на обоих концах и присоединение к свободным аминогруппам остатков лизина белка-носителя методом восстановительного аминирования [134, 158].

Другой подход, первоначально разработанный Гилеманом и внедренный в производство компаниями Aventis Pasteur и GSK, включает произвольную активацию гидроксильных групп полисахарида с помощью цианбромида [61], добавление сшивающего агента и присоединение к подходящему белку-носителю – как правило, столбнячному анатоксину через карбоксильные группы аспарагина или глутамина в присутствии водорастворимого карбодиимида.

Следующий подход к созданию конъюгированных вакцин заключается в конъюгировании полисахарида низкой молекулярной массы с комплексом белков (везикулой) наружной мембраны (OMP) *N. meningitidis* серогруппы В. В данном способе получения вакцин подходящим методом активируется как полисахарид, так и ОМР, к которым впоследствии присоединяется сшивающий агент, и далее реакция связывания происходит между двумя сшивающими агентами [114].

Помимо капсульного полисахарида Hib, для производства конъюгированных Hib-вакцин может использоваться полисахарид, полученный путем химического синтеза из доступных предшественников с образованием цепей сахаридов небольшого размера [58].

В частности, в Центре геной инженерии и биотехнологии (Республика Куба) для профилактики Hib инфекции была создана вакцина на основе синтетического PRP, конъюгированного со столбнячным анатоксином (Кими-Хиб®) [41, 58, 65].

Полирибозилрибитола фосфат, полученный синтетическим путем, представляет собой олигосахарид, содержащий от 6 до 9 повторяющихся единиц капсульного полисахарида *H. influenzae*, активированный с помощью N-гидроксисукцинимидного эфира β -малеимидпропионовой кислоты и содержащий малеимидную группу, через которую осуществляется конъюгирование с белком-носителем (рис.3).

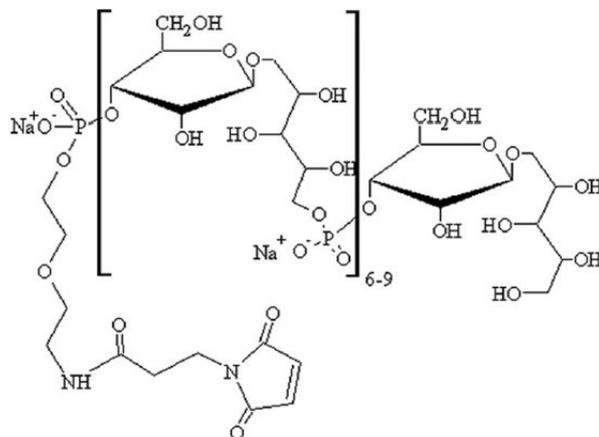


Рис. 3. Активированный синтетический полирибозилрибитола фосфат [65].

Процесс получения конъюгата синтетического полисахарида с белком-носителем столбнячным анатоксином осуществляется в 2 этапа. На первом этапе происходит модификация белка-носителя путем присоединения сульфгидрильных групп (SH-групп) к имеющимся в структуре анатоксина свободным аминогруппам (NH₂-группы). Сначала с помощью гомобифункционального сшивающего агента N-гидроксисукцинимидного эфира 3,3-дителиопропионовой кислоты в структуру белка вводятся дисульфидные группы, которые на следующем этапе, под действием дитиотреитола (ДТТ) подвергаются реакции восстановления с образованием сульфгидрильной группы (Рис. 4).

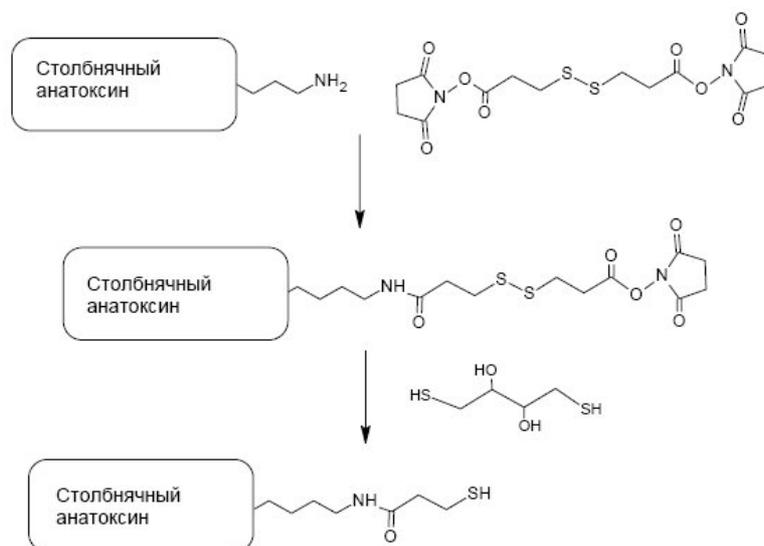


Рис. 4. Модификация белка-носителя с образованием сульфгидрильных групп.

На втором этапе активированный синтетический PRP ковалентно связывается с модифицированным столбнячным анатоксином (рис.5). Затем оставшиеся свободные активные SH-группы столбнячного анатоксина блокируются с помощью N-этилмалеимида (НЭМ).

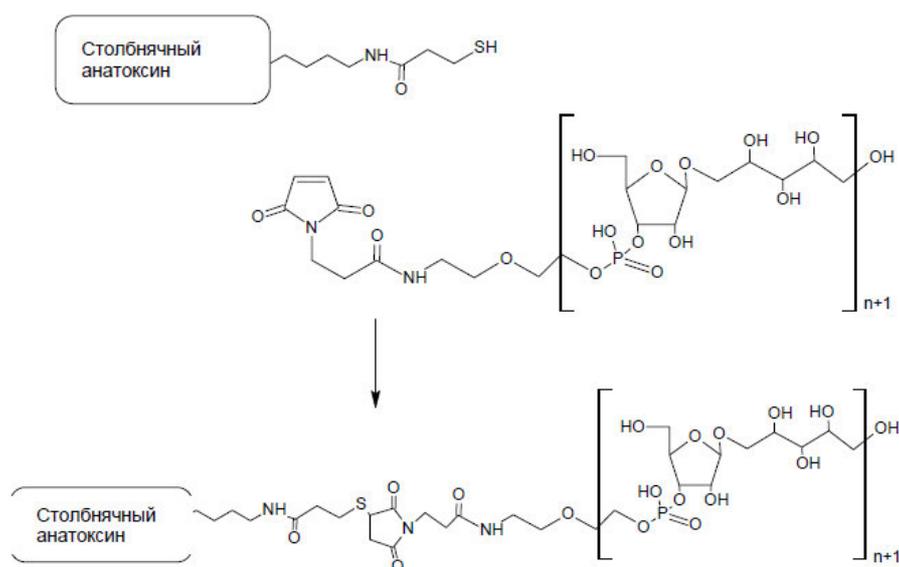


Рис 5. Образование конъюгата столбнячного анатоксина с PRR.

Результатом данного процесса является конъюгат, состоящий из синтетических олигомеров, содержащих в среднем 8 повторяющихся звеньев полирибозилрибитола, ковалентно связанных со столбнячным анатоксином [41].

Существуют и другие новые и многообещающие способы получения конъюгатов, например, биосинтез белка-носителя и повторяющихся единиц сахара в клетках *Escherichia coli* [108, 161].

1.3.2. Контроль качества конъюгированных Нib-вакцин

Процесс производства и контроля качества лекарственных средств, в том числе вакцин, должен быть организован таким образом, чтобы гарантировать получение продукта, соответствующего всем нормативным документам, и исключить риск получения лекарственного средства с неудовлетворительными качеством, безопасностью и эффективностью [52].

Анализ нормативных документов по контролю качества конъюгированных субстанций Нib и лекарственных форм на их основе на территории Российской Федерации, а также стран Европейского Союза и США представлен в таблице 1.

Общие требования к контролю качества конъюгированных Нib вакцин

Объект контроля	Стратегия контроля	Источники
Конъюгированная субстанция Нib	<ol style="list-style-type: none"> 1. Оценка подлинности, молекулярных параметров, специфической активности и чистоты субстанции. 2. Подтверждение соответствия разработанных методов контроля качества регуляторным требованиям (валидация). 	[24, 48, 99, 188]
Готовая лекарственная форма конъюгированной Нib вакцины	<ol style="list-style-type: none"> 1. Подтверждение однородности и воспроизводимости технологического процесса производства готовой лекарственной формы Нib вакцины. 2. Разработка спецификации контроля качества. 3. Подтверждение соответствия разработанных методов контроля качества регуляторным требованиям (валидация). 4. Оценка стабильности, безопасности и эффективности готовой лекарственной формы Нib вакцины. 	[24, 26, 48, 49, 50, 99, 116, 117, 185, 188]

Контроль качества субстанции Нib

Качество конъюгированной вакцины зависит от специфических иммунохимических и физических свойств полисахаридного компонента.

Требования, предъявляемые Европейской Фармакопеей к конъюгированным Нib-субстанциям, различаются и определяются входящим в состав конъюгата белком-носителем (табл. 2).

Требования к Нib-конъюгату для разрешенных для медицинского применения в настоящее время продуктов

Испытание	Белок-носитель			
	Дифтерийный анатоксин	Столбнячный анатоксин	CRM 197	OMP
Свободный PRP	< 37 %	< 20 %	< 25 %	< 15 %
Свободный белок	< 4 %	< 1 %, где это применимо	< 1% или < 2% в зависимости от метода связывания	Не применимо
Отношение PRP и белка	1,25 – 1,80	0,05 – 0,10	0,30 – 0,70	0,05 – 0,10
Размер молекул (процент площади пика основного вещества и коэффициент распределения Kd):				
Агароза поперечно-сшитая для хроматографии R	95% < 0,75	60% < 0,20	50% < 0,30-0,60	85% < 0,30
Агароза поперечно-сшитая для хроматографии R1	-/0,60-0,70	85% < 0,50	-	-

Среди различных биологических и физико-химических исследований конъюгата, используемого для приготовления вакцины, особенно важно определение его молекулярного размера. В исследованиях ряда авторов было показано, что молекулярный размер и структурные свойства конъюгата напрямую взаимосвязаны с иммунологическими свойствами и защитной эффективностью конъюгированной вакцины [93]. Кроме того, определение молекулярного размера конъюгата является ключевым индикатором постоянства производственного процесса, предоставляя данные о целостности конъюгата на отдельных этапах технологического цикла и последующего хранения.

Методы, использующиеся для определения молекулярного размера конъюгата, специфичны для каждой вакцины и включают эксклюзионную хроматографию с ультрафиолетовым, рефрактометрическим или MALLS-

детектированием [93, 115, 151, 156, 164]. Первоначально для характеристики молекулярного размера конъюгатов применяли методы гель проникающей хроматографии на мягких гелях, таких как Sepharose CL-4B и Superose 6 HR [63, 156], затем им на смену пришли методы эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [93, 115, 151]. Обладая высокой точностью и воспроизводимостью, они позволили значительно ускорить время проведения анализа и уменьшить количество используемого для анализа исследуемого образца [115, 147].

Специфическая активность конъюгированных Hib-вакцин определяется содержанием конъюгированного и свободного PRP. Увеличение содержания свободного PRP в процессе хранения указывает на нарушение целостности конъюгата белок-полисахарид, что в свою очередь ведет к снижению иммуногенности конъюгированных Hib-вакцин, поскольку только полисахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, то есть конъюгированный полисахарид, вызывает адекватный иммунный ответ у детей и является клинически эффективным.

Европейская Фармакопея рекомендует применять для установления содержания PRP колориметрические методы определения фосфора и рибозы или иммунохимические методы. Кроме того используются методы газовой хроматографии, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [67, 101, 108, 133, 162, 179]. Наиболее простым в исполнении и вместе с тем точным является колориметрический метод определения рибозы. С помощью данного метода можно детектировать до 3 нмоль рибозы. В результате международных исследований по определению содержания PRP в первом международном стандарте ВОЗ (PRP, NIBSC Code 02/208) межлабораторный коэффициент вариации (7 лабораторий) для данного метода составил 4,2 %. Наиболее переменчивым оказался метод высокоэффективной анионообменной жидкостной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием (HPLC-PAD), межлабораторный коэффициент вариации (7 лабораторий) для которого составил 16,5 % [101].

Для большинства конъюгированных вакцин, количество свободного полисахарида будет увеличиваться при хранении и является определяющим фактором при установлении сроков годности [104]. Установление содержания свободного PRP проводят методами, применяемыми для определения общего содержания полисахарида, предварительно отделив несвязанный PRP от конъюгированного, для чего используются такие методы как: осаждение, анионообменная жидкостная хроматография, эксклюзионная или гидрофобная хроматография, ультрацентрифугирование и ультрафильтрация [99].

Оценка подлинности конъюгированной субстанции Hib включает контроль подлинности полисахарида и белка-носителя. Согласно Европейской Фармакопее контроль подлинности рекомендуется проводить с помощью иммунохимических методов. Для реализации таких методов как иммунопреципитация, иммуноэлектрофорез, иммуноферментный анализ (ИФА) и иммуноблоттинг требуются высокоспецифичные реагенты. Распространенным методом для определения подлинности полисахаридов конъюгированных вакцин является спектроскопия ЯМР [67, 108, 133]. Подлинность белка-носителя столбнячного анатоксина может быть установлена в реакции коагуляции с использованием тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов «ТН-ДСК-КОА» [30]. Необходимым условием при оценке подлинности является специфичность используемого метода и отсутствие каких-либо мешающих факторов.

Маркером постоянства производственного процесса, отражающим относительные количества полисахарида и белка, вступившие во взаимодействие с образованием конъюгата, является соотношение полисахарида к белку, которое определяется расчетным методом на основании содержания полисахарида и белка [134]. Оптимальное соотношение определяется в ходе проведения доклинических или клинических исследований вакцинного препарата.

Для определения содержания белка в субстанции Ніб-вакцины используются стандартные колориметрические методы: Лоури, Бредфорда и метод с бицинхониновой кислотой.

Технология производства активной фармацевтической субстанции Ніб, входящей в состав вакцины, включает в себя этап химического синтеза PRP и реакцию конъюгирования с белком-носителем [41]. Данный способ получения субстанции предусматривает использование разнообразных химических реагентов и растворителей, в частности, восстанавливающего агента ДТТ, модификатора НЭМ, растворителя ДМСО и ЭДТА. Для очистки целевого продукта от избытка реагентов и отходов промежуточных этапов производства применяют метод диафильтрации через мембрану с порогом отсечения 30 кДа. В целях оценки безопасности биофармацевтического препарата в рамках фармацевтической разработки необходимо провести анализ остаточного содержания остаточных реагентов и растворителей [24, 125, 126]. В соответствии с ГФ XIII ДМСО относится к растворителям 3-го класса токсичности, содержание которых до 0,5% не требует подтверждения, а выше 0,5% допускается в фармацевтической субстанции, если это регламентировано стандартами производства. В этом случае вещество должно быть идентифицировано и определено количественно. Предельное содержание ЭДТА, НЭМ и ДТТ в биофармацевтических препаратах в настоящее время не регламентировано. Производителем субстанции Ніб установлены предельно допустимые нормы для следующих примесей: ДМСО ≤ 1.34 м.д., этилмалеимида ≤ 1 м.д. и ЭДТА ≤ 3.4 м.д. ДТТ имеет в составе сульфгидрильные группы, поэтому его определение проводят спектрофотометрически методом с реактивом Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота)) при длине волны 412 нм.

Как правило, для определения ДМСО используются методы газовой хроматографии [12, 88] и ЯМР [141].

Определение ЭДТА в образцах различной природы проводят с помощью широкого ряда аналитических методов: титриметрических [106],

фотометрических [5], методами квадратноволновой вольтамперометрии [90], капиллярного электрофореза [137, 142] и ионообменной хроматографии с МС-детектированием [137].

Данные методы точны и чувствительны, но зачастую для их воспроизведения требуется проведение специальной пробоподготовки анализируемого образца и наличие высокотехнологичного дорогостоящего оборудования, которым может быть оснащена не каждая аналитическая лаборатория.

Помимо приведенных выше методов для определения ЭДТА и ДМСО описаны различные варианты метода обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии [37, 59, 89, 91, 92, 180, 183]. При определении ДМСО в воде и сточных водах чувствительность методики количественного определения составила 0,5 мкг/мл (колонка Hypersil ODS5, 250×4,6 мм, 5 мкм, режим градиентного элюирования в системе ацетонитрил – вода) [180]. Для ЭДТА наибольшей чувствительностью обладала методика количественного определения ЭДТА в форме комплекса с Fe (III) в субстанции Меропенем [59]. Предел детектирования составил 0,023 мкг/мл, предел количественного определения - 0,034 мкг/мл (колонка Phenomenex Luna C18, 250×4,6 мм, 5 мкм, изократический режим элюирования в системе 5% метанола, 95% раствора бромид тетрабутиламмония (0,7 г/л) с ацетатом натрия (4,6 г/л) в воде, pH=4,0).

Одним из перспективных методов определения содержания примесей и остаточных органических растворителей в субстанции Ніб является метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Таким образом, активная фармацевтическая субстанция, используемая для производства конъюгированных Ніб-вакцин, согласно требованиям зарубежных и отечественных нормативных документов, должна быть охарактеризована по целому ряду показателей. Выбор методов контроля качества должен быть экономически обоснованным и обеспечивать получение результатов с высоким уровнем точности и воспроизводимости.

Контроль качества готовой лекарственной формы конъюгированной Hib-вакцины

В процессе контроля качества готовой лекарственной формы Hib-вакцины необходимо учитывать требования общей фармакопейной статьи «Вакцины и анатоксины» Государственной Фармакопеи [24], а также требования Европейской Фармакопеи и фармакопеи США к конъюгированным Hib-вакцинам [99, 181]. Показатели, оценка которых проводится с помощью стандартных методов в соответствии с ГФ XIII, включают рН, наличие механических включений, потерю в массе при высушивании (для лиофилизированных лекарственных форм), аномальную токсичность, стерильность, пирогенность.

Кроме вышеперечисленных показателей должна быть проведена оценка специфической активности методами *in vitro* и *in vivo*. Контроль специфической активности готовой лекарственной формы Hib-вакцины *in vitro* включает определение количественного содержания связанного и свободного PRP с помощью выше перечисленных методов. При этом определение PRP в лиофилизированных лекарственных формах колориметрическим методом по определению рибозы может быть затруднено и связано с введением в состав готовой лекарственной формы углеводного стабилизатора, который оказывает интерферирующее действие. Для устранения эффекта интерференции необходимо вводить стадию пробоподготовки.

Важнейшим условием производства лекарственных препаратов является обеспечение качества в первую очередь за счет выполнения правил Надлежащей производственной практики (GMP) [2, 13, 60]. Валидация аналитических методов контроля является одним из основополагающих принципов GMP.

Одним из основных критериев качества вакцины, который оказывает значительное влияние на эффективность программы иммунизации, является стабильность действующего вещества в процессе транспортирования и

хранения препарата. Вакцины, как класс иммунобиологических препаратов, представляющий собой сложный комплекс антигенов и вспомогательных веществ, подвержены действию различных факторов окружающей среды, которые могут снижать их активность. В процессе хранения конъюгированные вакцины могут подвергаться постепенной деполимеризации. Скорость деполимеризации может зависеть от многих факторов, таких как вид входящих в состав вспомогательных веществ и условий хранения. Деполимеризация может приводить к увеличению содержания свободного PRP, что в свою очередь приведет к снижению иммуногенности конъюгированной Hib-вакцины. Изучение профиля стабильности вакцины, отражающего способность продукта сохранять присущие химические, физические, микробиологические и биологические свойства в пределах установленных спецификаций, является неотъемлемой частью процесса производства [3, 4, 116, 117, 190].

Требования международных организаций и отечественных нормативных документов устанавливают режим хранения вакцин при температуре от 2 до 8 °С. Все показатели спецификации на готовую лекарственную форму Hib вакцины должны быть подтверждены на протяжении заявленного срока годности.

1.4. Вакцины для профилактики Hib-инфекции

В настоящее время в мировой медицинской практике имеется несколько десятков вакцинных препаратов для профилактики Hib-инфекции, среди них как моно, так и комбинированные вакцины (табл. 3 и 4).

Следует отметить, что перечень отечественных конъюгированных вакцин против Hib-инфекции состоит из одного вакцинного препарата производства ФГУН Ростов НИИМП Роспотребнадзора [42], который по неизвестным причинам не нашел широкого применения.

Некоторые конъюгированные вакцины против Нib-инфекции,
разрешенные к медицинскому применению

Препарат	Торговое наименование	Производитель	Белок носитель	Природа полисахарида	Количество PRP в дозе, мкг	Лекарственная форма	Вспомогательные вещества
1	2	3	4	5	6	7	8
PRP-T	Хиберикс®	ГлаксоСмитКляйн, Бельгия	ТТ	Капсульный	10	Лиофилизат	Фосфат алюминия Лактоза 12,6 мг
PRP-T	Акт-Нib	Санофи Пастер, Франция	ТТ	Капсульный	10	Лиофилизат	Трометамол 0,6 мг Сахароза 42,5 мг
PRP-T	Вакцина гемофильная тип b конъюгированная	ФГУН Ростов НИИМП Роспотребнадзора, Россия	ТТ	Капсульный	10	Лиофилизат	Сахароза 20-30 мг
PRP-T	Кими-Хиб®	Центр генетической инженерии и биотехнологии, Куба	ТТ	Синтетический	10	Жидкая	Тиомерсал 0,025 мг Натрия хлорид 4 мг Дигидрофосфат натрия двухводный 0,62 мг Гидрофосфат натрия 0,56 мг
PRP-OMP	Pedvax Hib	Мерк Шарп и Доум Корп, США	OMP	Капсульный	7.5	Жидкая	Аморфный гидроксифосфат-сульфат алюминия 225 мкг Натрия хлорид 0,9%
НbOC	Vaxem Hib	Новартис вакцины и диагностика, Италия	CRM-197	Капсульный	10	Жидкая	Фосфат алюминия 1,36 мг Натрия хлорид Полисорбат 80 Гидрофосфат натрия двухводный Дигидрофосфат натрия

Конъюгированные моновакцины для профилактики Нib-инфекции выпускаются в жидкой и лиофилизированной форме. С точки зрения стабильности вакцины при ее транспортировке и хранении лиофилизированная форма имеет несомненное преимущество [72, 79]. Так, применяющиеся в России конъюгированные вакцины (Хиберикс® и Акт-ХИБ®) выпускаются в виде лиофилизата в комплекте с растворителем, которым служит раствор натрия хлорида. По результатам наблюдений вакцины хорошо переносятся, приводят к развитию выраженного иммунного ответа против Нib и в результате к снижению заболеваемости острыми респираторными инфекциями [40, 56].

Глобальной тенденцией вакцинопрофилактики на протяжении последних десятилетий является использование комбинированных вакцин, содержащих все большее количество антигенов. Создание комбинированных вакцин для профилактики нескольких инфекций началось с вакцин АКДС, которые были необходимы для достижения максимального охвата в отношении 3 наиболее опасных инфекций детского возраста – дифтерии, столбняка и коклюша. Данная вакцина была впервые использована для вакцинации детей раннего возраста в 1948 году, и с тех пор ее состав неоднократно менялся [14]. Важным достижением была замена цельноклеточного коклюшного антигена менее реактогенными бесклеточными антигенами в начале 1990х годов [81]. При этом аАКДС вакцины различных производителей очень похожи по своему составу, основные отличия связаны с числом, количеством и методом обезвреживания коклюшных компонентов. Следующим этапом совершенствования АКДС-вакцин стало включение в их состав антигенов, позволяющих обеспечить защиту от таких инфекционных заболеваний, как гепатит В (Геп В), полиомиелит (ИПВ) и гемофильная инфекция [20]. Первой многокомпонентной вакцине, основанной на сочетании АКДС и Hib «ПентАкт-Hib» (АКДС+ИПВ+ Hib) производства «Авентис Пастер» в 1992 г. была присуждена европейская премия Галена за вклад в развитие фармакологии. Последнее достижение в области разработки комбинированных вакцин представляют вакцины «Infanrix®Hexa» (зарегистрирована в РФ) (аАКДС-ИПВ-ГепВ/Hib) производства «ГлаксоСмитКляйн» (Бельгия), «Hexaxim®» и «Vaxelis®» (аАКДС-ИПВ-ГепВ-Hib) производства «Санофи Пастер» (Франция), которые защищают от 6 инфекций [57, 81, 150].

Некоторые из комбинированных вакцинных препаратов, включающих гемофильный компонент, представлены в таблице 4. Широкое внедрение комбинированных вакцин в разных странах подчеркивает их неоспоримые преимущества перед моновалентными препаратами. Основная причина

внедрения комбинированных вакцин в практику иммунизации заключается в снижении числа инъекций, которые ребенок получает в первые годы жизни. Такие вакцины позволяют уменьшить затраты на иммунизацию и повысить приверженность населения к вакцинации, а также позволяют расширить программы иммунизации у детей раннего возраста [19, 40, 55, 97, 150].

Некоторые комбинированные вакцины против Н1b-инфекции, разрешенные к медицинскому применению

Препарат*	Торговое наименование	Производитель	Белок носитель	Природа полисахарида	Количество PRP, мкг/доза	Лекарственная форма	Адьювант	Консервант	Другие вспомогательные вещества
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PRP-Т/аАКДС-ИПВ-Геn В	Infanrix®Hexa	ГлаксоСмитКляйн, Бельгия	ТТ	Капсульный	10	Лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения	Алюминия гидроксид Алюминия фосфат	-	Лактоза Натрия хлорид Формальдегид Полисорбат 20 и 80 Среда М199 Калия хлорид Натрия фосфат Глицин Монофосфат калия Неомицин сульфат Полимиксин В сульфат
PRP-Т/аАКДС-ИПВ	Пентаксим	Санофи Пастер, Франция	ТТ	Капсульный	10	лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения	Алюминия гидроксид	-	Сахароза Трис Среда 199 с солями Хенкса Формальдегид Феноксэтанол
PRP-Т-аАКДС-ИПВ-Геn В	Hexaxim®	Санофи Пастер, Франция	ТТ	Капсульный	12	Жидкая	Алюминия гидроксид	-	Динатрия гидрофосфат Калия дигидрофосфат Трис Сахароза
PRP-Т-аАКДС-ИПВ-Геn В	Vaxelis®	Санофи Пастер, Франция	OMP	Капсульный	3 мкг/50 мкг	Жидкая	Алюминия фосфат Алюминия гидроксифосфат сульфат	-	-
PRP-CRM197-АКДС	Quattvaxem	Новартис вакцины и диагностика, Италия	CRM-197	Капсульный олигосахарид	10	Жидкая	Алюминия фосфат	Тиомерсал	Натрия хлорид

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PRP-T/ АКДС	TETRAAct- HIB	Санофи Пастер, Франция	ТТ	Капсульный	10	Лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения	Алюминия гидроксид	Тиомерсал	Натрия хлорид Натрия гидрофосфат двухводный Калия дигидрофосфат
PRP-T/ АКДС	QUADROV AX	Институт сыворотки, Индия	ТТ	Капсульный	10	Лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения	Алюминия фосфат	Тиомерсал	-
PRP- CRM197/ АКДС – Геп В	Quinvaxem	Берна Биотех Корея	CRM- 197	Капсульный олигосахар ид	10	Жидкая	Алюминия фосфат	-	Натрия хлорид
PRP-T/ АКДС – Геп В	Tritanrix HB+Hib	ГлаксОСмитКляй н, Бельгия	ТТ	Капсульный	10	Лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения	Алюминия гидроксид Алюминия фосфат	Тиомерсал	Лактоза 2-феноксиэтанол Натрия хлорид
PRP-T/ АКДС – Геп В	Euforvac- Hib	ЭлДжи Лайф Сайенс, Республика Корея	ТТ	Капсульный	10	Лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения	Алюминия гидроксид	Тиомерсал	Формальдегид Полисорбат Лактоза
PRP-T- АКДС – Геп В	Easyfive-ТТ	Панацея Биотех, Индия	ТТ	Капсульный	10	Жидкая	Алюминия фосфат	Тиомерсал	Натрия хлорид
PRP-T- АКДС – Геп В	Heberpenta	Центр генной инженерии и биотехнологии, Республика Куба	ТТ	Синтетичес кий	10	Жидкая	Алюминия гидроксид	Тиомерсал	Натрия хлорид Динатрия гидрофосфат Дигидрофосфат натрия двухводный

Примечание: АКДС – вакцина против дифтерии, столбняка и коклюша с цельноклеточным коклюшным компонентом; Геп В – вакцина против гепатита В; ИПВ – инактивированная полиомиелитная вакцина; аАКДС - вакцина против дифтерии, столбняка и коклюша с бесклеточным коклюшным компонентом; PRP - полирибозилрибитола фосфат; PRP-T – полирибозилрибитола фосфат, конъюгированный со столбнячным анатоксином; PRP- CRM197 – полирибозилрибитола фосфат, конъюгированный с рекомбинантным нетоксичным вариантом дифтерийного токсина; ТТ – столбнячный анатоксин; CRM-197 - рекомбинантный нетоксичный вариант дифтерийного токсина; ОМР - белком внешней мембраны *Neisseria meningitidis* группы В

Наряду с явными преимуществами перед моновакцинами комбинированные вакцины оставляют за собой еще ряд нерешенных вопросов перед исследователями. Основная сложность при их разработке связана с риском снижения эффективности или безопасности комбинации в сравнении с вакцинами, введенными по отдельности. Вновь разработанные комбинированные препараты не должны быть менее иммуногены, менее эффективны или более реактогенны, чем зарегистрированные ранее препараты.

Самый распространенный пример иммунной интерференции, имеющий место при применении комбинированных вакцин на основе аАКДС – это снижение титров антител к Hib компоненту вакцины. Такие случаи были зарегистрированы для многих вакцин на основе аАКДС, включая шестивалентную вакцину аАКДС-Геп В- ИПВ/Hib [87, 109, 160]. В ходе многочисленных исследований эффективности комбинированных вакцин при иммунизации детей первого года жизни препаратами аАКДС, ИПВ и PRP-T в различных комбинациях, было установлено значительное снижение иммунного ответа на PRP и ИПВ антигены при совместном введении, по сравнению с отдельным введением [118, 175, 176]. И все же, у большинства из этих детей наблюдался защитный уровень антител к Hib более 0,15 мкг/мл [118, 177]. Следует отметить, что подобного эффекта не было установлено для комбинированных вакцин, содержащих цельноклеточный коклюшный компонент, главным образом благодаря его адьювантирующему эффекту [82, 85, 86, 121]. Однако, этот эффект вероятно маскирует существующую интерференцию, а механизм по которому ответ на Hib снижается после комбинирования с поливалентными вакцинами, содержащими коклюшный компонент, сложен и все еще до конца не изучен.

Тем не менее, после завершения первичного курса вакцинация комбинированными препаратами аАКДС+Hib, наблюдается формирование напряженного иммунного ответа и развитие иммунологической памяти [69, 77, 83, 118, 168, 182]. Кроме того, комбинированные вакцины, сочетающие

АКДС (как с цельноклеточным, так и с бесклеточным коклюшным компонентом), ИПВ и Ніб антигены, являются клинически эффективными, вызывая иммунный ответ ко всем антигенам у 98,8% привитых после завершения первичного курса вакцинации [57, 75, 86, 98, 122, 128, 143, 191].

Другое объяснение сниженному иммунному ответу на Ніб антиген при комбинировании с АКДС вакцинами состоит в несовместимости с адьювантами на основе солей алюминия (алюминия гидроксид, алюминия фосфат и алюминия гидроксифосфат), которые широко используются для повышения иммуногенности вакцин АКДС [65, 144]. Существуют данные исследований доказывающие, что соединения гидроксида алюминия вызывают гидролиз фосфодиэфирной связи полирибозилрибитола фосфата. Такая реакция приводит к высвобождению неконъюгированного PRP и как следствие к потере эффективности вакцинного препарата [111, 172].

В связи с этим многие производители выпускают Ніб-компонент комбинированной вакцины в лиофилизированной форме, растворителем для которого служат суспензии АКДС (в различных комбинациях с ИПВ и Геп В вакцинами). Это позволяет сократить контакт Ніб антигена с алюминиевым адьювантом, сохранить присущие активному компоненту иммунологические свойства и повысить стабильность вакцины в процессе хранения.

Таким образом, взаимодействия, которые могут происходить между компонентами вакцины, непредсказуемы, сложны и во многих случаях непостоянны и могут быть функцией одного из компонентов вакцины. Поэтому в процессе включения новых антигенов в существующие комбинированные препараты важным моментом становится изучение совместимости и конкурентности компонентов в составе комбинированных вакцин, а также доказательство того, что новая комбинация не снижает иммунологической эффективности компонентов.

Анализируя состав существующих моновакцин и комбинированных препаратов, применяемых для профилактики Ніб-инфекции, можно заметить, что практически все они содержат природный полисахарид капсулы Ніб.

Исключение составляют вакцины Кими-Хиб® (PRP-T) и Hederpenta (PRP-T-АКДС-Геп В) производства Центра генной инженерии и биотехнологии (Республика Куба), гемофильный антиген которых получен с помощью реакций химического синтеза. Комбинированная вакцина Hederpenta выпускается в жидкой форме. Вакцина поставляется в двух флаконах, один из которых содержит адсорбированную вакцину АКДС-Геп В (0,5 мл), второй – конъюгированную PRP-T вакцину в жидкой форме (10 мкг PRP в 0,25 мл), которые смешиваются в шприце непосредственно перед введением. Таким образом, объем препарата составляет 0,75 мл, что в значительной степени затрудняет введение препарата ребенку в возрасте 3-18 месяцев. В России применение вакцинного препарата в такой дозе является неприемлемым, поскольку может ухудшить восприятие вакцинации и, как следствие, снизить охват детского населения прививками.

Таким образом, самая распространенная форма выпуска Hib-компонента комбинированных вакцин в виде лиофилизата является наиболее оптимальной. В объеме 0,5 мл вводится от 4 до 6 антигенов, что снижает суммарную инъекционную нагрузку на ребенка, а также позволяет сохранить присущие активному компоненту иммунологические свойства и повысить стабильность вакцины в ходе хранения, исключая длительный контакт Hib-антигена с адьювантами на основе солей алюминия.

Уже много лет для вакцинации детей раннего возраста в России широко используются отечественные комбинированные вакцины АКДС и АКДС-Геп В производства филиала АО НПО «Микроген» в г. Перми «Пермское НПО «Биомед» [36]. В последние годы на лидирующие позиции в детской заболеваемости и смертности в России выходит Hib-инфекция, вызывая не менее трети случаев ОРЗ, до 25 % случаев воспаления легких, до 55 % менингитов и около 20 % отитов у детей в возрасте до 5 лет [23, 31, 40, 54]. Расширение числа инфекций, контролируемых специфической профилактикой, обуславливает необходимость максимально широкого использования различных комбинаций вакцинных препаратов. Включение

нового антигена в уже зарекомендовавшую себя комбинацию является следующим шагом на пути создания современных отечественных комбинированных вакцин. На данном этапе наибольшую практическую ценность представляют исследования по разработке лиофилизированной формы Hib-компонента на основе синтетического полирибозилрибитола фосфата для его последующего включения в состав поливалентных АКДС вакцин, содержащих как цельноклеточный, так и бесклеточный коклюшный компонент.

В заключении следует сказать, что разработка комбинированных вакцин является современной тенденцией развития вакцинопрофилактики. Проведение вакцинации детей первого года жизни против Hib-инфекции с помощью комбинированных препаратов соответствует рекомендациям ВОЗ. Благодаря введению 4-6 антигенов с помощью одной инъекции, ребенок обеспечен защитой сразу от нескольких опасных инфекций, при этом сокращается число визитов к врачу и снижается риск побочных реакций за счет меньшего количества балластных веществ, по сравнению с моновакцинами. Таким образом, использование комбинированных вакцин отвечает интересам детей, родителей, медицинских работников, организаторов здравоохранения и общества в целом.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

В работе использовали субстанцию синтетического полирибозилрибитола фосфата, конъюгированного с белком носителем столбнячным анатоксином (субстанцию Hib), производства Центра Генной инженерии и Биотехнологии (ЦГИБ) Республики Куба (ФС-000757), следующих серий: 53IFA1110, 53IFA1205 и 53IFA1210, 53IFA1407.

Синтетический полирибозилрибитола фосфат получен с помощью реакций химического синтеза из D-рибозы и представляет собой олигосахарид, содержащий от 6 до 9 повторяющихся единиц капсульного полисахарида *H. Influenzae*.

Субстанция Hib представляет собой прозрачную светло-желтую жидкость, не содержащую взвешенных частиц.

Все серии субстанции имели следующий состав:

Активное вещество: полирибозилрибитола фосфат, конъюгированный со столбнячным анатоксином (по полирибозилрибитола фосфату) - не менее 0,5 мг/мл.

Вспомогательные вещества: натрия хлорид (7,9 мг/мл), натрия дигидрофосфат дигидрат (1,4 мг/мл), динатрия гидрофосфат дигидрат (1,24 мг/мл), натрия дигидрофосфат моногидрат (1,24 мг/мл), динатрия гидрофосфат (0,99 мг/мл), вода для инъекций до 1 мл.

Условия хранения: хранить при температуре от 2 до 8°C.

2.2. Материалы

Рабочий референс-материал *Haemophilus influenzae* тип b - GF Hib (ЦГИБ, Республика Куба).

Международный стандарт ВОЗ. Полисахарид *Haemophilus influenzae* тип b полирибозилрибитола фосфат (PRP), 02/208 («NIBSC», UK).

Натриевая соль дезоксирибонуклеиновой кислоты семенников лосося (Deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon testes, Sigma, кат.№ D1626-1G).

«Тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаггутинации (ТН-ДСК-КОА)» (филиал АО «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь ТУ 9388-164-14237183-2012).

Ультрафильтрационные концентраторы Amicon Ultra-0,5 с порогом отсечения 10 кДа и Amicon Ultra-15 с порогом отсечения 10 кДа («Millipore», Германия).

2.2.1. Препараты сравнения

АКДС-Геп В - вакцина для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В адсорбированная жидкая производства филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед».

Пентаксим[®] - вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомиелита инактивированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная производства «Sanofi Pasteur», Франция.

Акт-ХИБ[®] - вакцина для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, производства Sanofi Pasteur, Франция (полисахарид капсулы Hib, конъюгированный со столбнячным анатоксином).

Кими-Хиб[®] - вакцина для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, производства HeberBiotech, Республика Куба (синтетический полисахарид, идентичный капсульному, конъюгированный со столбнячным анатоксином).

Хиберикс[®] - вакцина для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, производства «GlaxoSmithKline», Бельгия (полисахарид капсулы Hib, конъюгированный со столбнячным анатоксином).

2.1.2. Иммуноферментные тест-системы

Набор реагентов «ИФА Анти-Кок» (тест-система для количественного определения антител против *Bordetella pertussis* IgG класса в сыворотке крови

животных методом иммуноферментного анализа) (филиал АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»).

Наборы реагентов «ИФА Анти-ДС» (тест-система иммуноферментная для выявления антитоксических дифтерийных и столбнячных антител) (филиал АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»);

Тест-система иммуноферментная для определения антител к поверхностному антигену вируса гепатита В «МикрАТ-НВs» (филиал АО «НПО «Микроген» в г. Нижний Новгород «ИмБио»);

Тест-система иммуноферментная для определения антител к полисахариду *H. Influenzae* тип b «Rabbit Anti-*Haemophilus influenzae* type b IgG ELISA Assay» («XpressBio», США).

2.2. Оборудование

Хроматографическая система Ultimate 3000 («Dionex Thermo Scientific», Германия), включающая:

- автосамплер с возможностью поддержания температуры образцов +4°C;
- двухплунжерный насос;
- термостатируемое колоночное отделение;
- матричный фотодиодный и флуориметрический детектор
- компьютер с установленной программой сбора и обработки хроматографических данных «Cromleon»;

Хроматографическая система LC-20 Prominence («Shimadzu», Япония), включающая:

- контроллер CBM-20A;
- двухплунжерный насос LC-20AD;
- автоинжектор с возможностью поддержания температуры образцов +4°C SIL-20ACXR;
- термостатируемое колоночное отделение CTO-20AC;
- диодноматричный детектор SPD-M20A;

- компьютер с установленной программой сбора и обработки данных «LabSolution».

Хроматографическая система Smartline («Knauer», Германия), включающая:

- менеджер растворов с блоком дегазатора;
- изократический насос Smartline 1000;
- ручной инжектор;
- ультрафиолетовый детектор Smartline 2550;
- компьютер с установленной программой сбора и обработки хроматографических данных «Clarity Chrom».

Хроматографическая колонка Kromasil 100-5C18, 150 x 4.8 мм, 5 мкм, («AkzoNobel», Голландия).

Хроматографическая колонка TSK-Gel G5000 PWXL, 7,8 x 300 мм, 10 мкм («Tosoh Bioscience LLC», Япония).

Предколонка TSK-Gel PWXL Guard Column 6,0 x 40 мм («Tosoh Bioscience LLC», Япония).

2.3. Лабораторные животные

Кролики породы шиншилла весом 1,8 – 2,0 кг (самки) для изучения иммуногенности и 2,0 – 2,5 кг (самцы и самки) для изучения местного раздражающего действия (лаборатория подопытных животных филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»).

Морские свинки весом 250-350 г в возрасте 1,5-2 мес. (лаборатория подопытных животных филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»).

Мыши беспородные (б/п) весом 14-18 г в возрасте 1-1,5 мес. (лаборатория подопытных животных филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»).

2.4. Методы

2.4.1. Фармакопейные методы анализа

Определение белка

Определение белка в активной фармацевтической субстанции проводили в соответствии с ГФ XIII (ОФС.1.7.2.0023.15) [24] методом Лоури (без предварительного осаждения белка). Оптическую плотность образцов определяли на КФК-2 при длине волны 750 нм.

Определение осмоляльности

Осмоляльность Нib-вакцины измеряли в соответствии с ГФ XIII (ОФС.1.2.1.0003.15) [24] криоскопическим методом, основанным на понижении точки замерзания растворов по сравнению с точкой замерзания чистого растворителя. Измерения проводили с помощью полумикроосмометра К-7400 производства «KNAUER», Германия.

pH

Определение pH активной фармацевтической субстанции и Нib-вакцины проводили потенциометрическим методом в соответствии с ГФ XIII издания [24].

Механические включения

Видимые механические включения в Нib-вакцине определяли визуально согласно ГФ XIII издания (ОФС.1.4.2.0005.15) [24].

Потеря в массе при высушивании

Определение потери в массе при высушивании проводили весовым методом в соответствии с ГФ XIII издания (ОФС.1.2.1.0010.15) [24].

Определение формальдегида

Определение формальдегида в комбинированных вакцинах проводили колориметрическим методом с использованием фуксинсернистой кислоты согласно ГФ XIII издания (ОФС.1.7.2.0025.15) [24].

Определение алюминия

Определение ионов алюминия в комбинированных вакцинах проводили комплексонометрическим методом согласно ГФ XIII издания (ОФС.1.7.2.0016.15) [24].

Стерильность

Определение стерильности активной фармацевтической субстанции и Нib-вакцины проводили методом прямого посева в соответствии с ГФ XIII издания (ОФС.1.2.4.0003.15) [24]. Для контроля использовали тиогликолевую среду. Посевы инкубировали при температурах 30-35 °С и 20-25 °С.

Пирогенность

Испытание активной фармацевтической субстанции и лиофилизированной Нib-вакцины проводили согласно ГФ XIII издания (ОФС.1.2.4.0005.15) [24]. Тест доза составляла 0,1 мкг полирибозилирибитола фосфата на 1 кг массы кролика.

Бактериальные эндотоксины

Определение бактериальных эндотоксинов проводили в хромогенном тесте по конечной точке (метод Е) согласно ГФ XIII издания (ОФС.1.2.4.0006.15) [24].

Аномальная токсичность

Определение аномальной токсичности Нib-вакцины проводили на белых мышах и морских свинках в соответствии с ГФ XIII издания (ОФС.1.2.4.0004.15) [24].

Иммуногенность столбнячного компонента

Определение специфической (иммуногенной) активности столбнячного компонента, входящего в состав комбинированных вакцин, проводили в тесте выживаемости на белых мышах согласно ГФ XIII издания (ОФС.1.7.2.0004.15) [24].

Иммуногенность дифтерийного компонента

Определение специфической (иммуногенной) активности дифтерийного компонента, входящего в состав комбинированных вакцин

проводили в тесте выживаемости на морских свинках согласно ГФ XIII издания (ОФС.1.7.2.0003.15) [24].

Иммуногенность цельноклеточного коклюшного компонента

Определение специфической (иммуногенной) активности цельноклеточного коклюшного компонента, входящего в состав комбинированных вакцин, проводили в тесте выживаемости на белых мышах согласно ГФ XIII издания (ОФС.1.7.2.0005.15) [24].

2.4.2. Физико-химические методы анализа

Определение содержания полирибозилрибитола фосфата

Количественное определение содержания PRP в активной фармацевтической субстанции и Hib-вакцине проводили колориметрическим методом с орцином. Метод основан на взаимодействии гидролизованной формы рибозы с орцином в присутствии соли железа (III), в результате которого образуется комплексное соединение зеленого цвета, хорошо растворимое в воде.

В качестве стандартных растворов использовали растворы D-рибозы при известных концентрациях в интервале от 2,5 до 40 мкг/мл. Оптическую плотность стандартных и испытуемых растворов измеряли при длине волны 670 нм. По полученным результатам строили график зависимости оптической плотности стандартных растворов от концентрации.

Концентрацию D-рибозы (мкг/мл) в исследуемом образце рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{A - b}{p \cdot F}$$

A – оптическая плотность раствора при 670 нм;

b – точка пересечения калибровочной кривой с осью координат;

p – тангенс угла наклона калибровочной кривой;

F – фактор разведения образца (например, если образец разбавили в 2 раза, фактор разведения будет равен 1/2)

Для пересчета концентрации D-рибозы в концентрацию PRP (мкг/мл) с учётом отношения молекулярных масс использовали формулу:

$$C_f = C \cdot 2,5$$

C_f – концентрация PRP в исследуемом образце, мкг/мл;

C – концентрация D-рибозы в исследуемом образце, мкг/мл;

2,5 – коэффициент пересчета, равный отношению молекулярных масс рибитола фосфата к D-рибозе.

Содержание PRP в мкг (C_{PRP}) в одной дозе вакцины рассчитывали по формуле:

$$C_{PRP} = C_f \cdot 0,5$$

0,5 – объем одной дозы Hib-вакцины, мл.

Содержание PRP в процентах от номинального содержания ($C\%$) рассчитывали по формуле:

$$C\% = \frac{C_{PRP}}{C_v} \cdot 100\%$$

C_v – номинальное значение содержания PRP в ампуле, равное 10 мкг.

Результаты анализа считали достоверными если:

1. Разница оптической плотности растворов D-рибозы с содержанием 2,5 мкг/мл и 40,0 мкг/мл составляла не менее 0,2 оптических единиц (о.е.);
2. Испытуемые образцы и стандартные растворы имели зеленое окрашивание.

Соотношение полирибозилрибитола фосфат : столбнячный анатоксин

Определение соотношения полирибозилрибитола фосфат : столбнячный анатоксин проводили расчетным методом.

Соотношение рассчитывали по формуле:

$$S = C_{PRP} / C_P, \text{ где}$$

C_{PRP} - концентрация полирибозилрибитола фосфата, мг/мл;

C_p - концентрация белка столбнячного анатоксина в испытуемом образце, мг/мл.

Остаточные функциональные группы

Определение остаточных функциональных групп в активной фармацевтической субстанции проводили методом Элмана. Метод основан на реакции окисления-восстановления между реактивом Элмана (5,5'-Дитиобис(2-нитробензойная кислота)) и свободными сульфгидрильными группами белка (столбнячного анатоксина). В результате реакции образуется 2-нитро-5-тиобензойная кислота, которая легко переходит в хиноидную форму в воде при нейтральных и щелочных рН, имеет ярко-жёлтую окраску и обладает интенсивным поглощением при 412 нм.

В качестве стандартных растворов использовали растворы глутатиона в известных концентрациях в интервале от 0,25 до 4,0 мкмоль/мл. Оптическую плотность стандартных и испытуемых растворов измеряли при длине волны 412 нм относительно контрольного раствора. По полученным результатам строили график зависимости оптической плотности стандартных растворов от концентрации.

Содержание SH-групп C_{SH} (мкмоль/мл) в испытуемом образце рассчитывали по формуле:

$$C_{SH} = \frac{A - b}{p \cdot F}, \text{ где}$$

A – значение оптической плотности испытуемой субстанции;

b – точка пересечения калибровочной кривой с осью координат;

p – тангенс угла наклона калибровочной кривой;

F – фактор разведения образца.

Полученный результат делят на концентрацию белка.

Пересчет концентрации белка из мг/мл в мкмоль/мл:

$$C_B = \frac{C_p}{150}, \text{ где}$$

C_B – концентрация белка столбнячного анатоксина в испытуемом образце, мкмоль/мл;

C_p – концентрация белка столбнячного анатоксина в испытуемом образце, мг/мл;

150 – молекулярная масса столбнячного анатоксина, выраженная в кДа (150 кДа соответствует 150 кг/моль).

Результат определения остаточных функциональных групп (SH) выражают как C_{SH}/C_B .

Определение молекулярных параметров

Определение молекулярных параметров активной фармацевтической субстанции проводили методом гель-фильтрационной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГФ-ВЭЖХ) с помощью хроматографической системы Smartline и хроматографической колонки TSK-Gel G5000 PWXL, снабженной предколонкой TSK-Gel PWXL Guard Column («Tosoh Bioscience LLC», Япония).

Условия проведения хроматографии:

Подвижная фаза (ПФ)	Натрия гидрофосфат - 7,9 мМ, калия дигидрофосфат - 1,7 мМ, калия хлорид - 2,7 мМ, натрия хлорид - 0,25 М, рН (7,0±0,1)
Скорость потока	0,6 мл/мин
Режим элюирования	Изократический
Температура колонки	25 °С
Детектирование при длине волны	226 нм
Объем вводимой пробы	100 мкл
Продолжительность анализа	35 мин

Определение остаточных реагентов

Определение остаточных количеств ЭДТА, ДМСО и НЭМ в активной фармацевтической субстанции проводили методом ОФ-ВЭЖХ с помощью хроматографических систем Ultimate 3000 («Dionex Thermo Scientific»,

Германия) и LC-20 Prominence («Shimadzu», Япония) и хроматографической колонки Kromasil 100-5C18 («AkzoNobel», Голландия).

Условия проведения хроматографии:

ПФ	14 мМ ортофосфорная кислота, (рН 2,1)
Скорость потока	1,0 мл/мин
Режим элюирования	Градиентный
Температура колоночного отделения	35°С
Детектирование при длине волны	210 и 245 нм
Объем вводимой пробы	30 мкл
Продолжительность анализа	17 мин

2.4.3. Иммунохимические и иммунобиологические методы анализа

Реакция коаггуляции (РКОА)

Определение подлинности белка-носителя активной фармацевтической субстанции и Нib-вакцин проводили в РКОА с применением набора реагентов «Тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаггуляции (ТН-ДСК-КОА)» (ТУ 9388-164-14237183-2012) [6]. Набор укомплектован диагностикумом на основе аффинно-очищенных антител кролика против столбнячного анатоксина, сорбированных на белке А инактивированного стафилококка штамма Cowan I, контрольными положительными образцами и концентратом для приготовления 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора рН (7,3±0,1). Контрольным образцом являлся очищенный концентрированный столбнячный анатоксин. РКОА выполняли на стекле. Приготовленные разведения исследуемого материала переносили на стекло по одной капле (10 мкл). Затем к этим разведениям добавляли столбнячный диагностикум в равном объеме и перемешивали, осторожно покачивая стекло в руках. Результаты РКОА учитывали в пределах 5-10 минут визуально по

образованию агглютинатов. Каждое исследование сопровождалось постановкой контроля на специфичность реакции. Оценку результатов реакции проводили по общепринятой 4-х крестной системе [6, 29].

Полнота сорбции дифтерийного и столбнячного анатоксина

Определение полноты сорбции дифтерийного и столбнячного компонентов комбинированных вакцин проводили в РКОА с применением набора реагентов «ТН-ДСК-КОА» в соответствии инструкцией по применению.

Приготовленные контрольные положительные образцы до разведения содержат:

- контрольный положительный образец антигена столбнячного (АС) – 1 Lf/мл;

Разведение контрольных положительных образцов и проведение анализа выполняли согласно инструкции набора реагентов ТН-ДСК-КОА [29].

Подготовка исследуемых образцов

Для контроля полноты сорбции 2 мл адсорбированного препарата центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин. Прозрачную надосадочную жидкость препарата аккуратно переносили в чистую стеклянную пробирку (флакон). Далее готовили ряд последовательных двукратных разведений (таблица 1 инструкции по применению набора реагентов).

Анализ и учет результатов проводили в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов ТН-ДСК-КОА.

Содержание антигена дифтерийного и антигена столбнячного в надосадочной жидкости рассчитывали, исходя из чувствительности набора реагентов, при контроле положительных образцов согласно таблице 2 инструкции по применению набора реагентов ТН-ДСК-КОА [29].

Полнота сорбции HBsAg

Определение содержания HBsAg в надосадочной жидкости проводили методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем для выявления

НВsAg с чувствительностью не более 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкцией по применению.

Определение иммуногенности Нib-вакцины

Определение иммуногенности Нib-вакцины проводили в тесте «in vivo» на кроликах (самках). Вакцину вводили внутримышечно (в область верхней трети бедра) 4 кроликам весом 1,8-2,0 кг в дозе 10 мкг/0,5 мл. Повторную иммунизацию животных проводили на 14 день, забор крови на 21 день.

В полученных сыворотках от каждого животного контролировали содержание антител с помощью иммуноферментной тест-системы для определения антител к полисахариду *H. Influenzae* тип *b* «Rabbit Anti-*Haemophilus influenzae* type *b* IgG ELISA Assay» («XpressBio», США) в соответствии с инструкцией по применению. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки группы не иммунизированных животных. Положительными считали сыворотки, оптические плотности (ОП) которых равны или выше среднего арифметического ОП сывороток группы отрицательного контроля плюс 2 стандартных отклонения. Процент сероконверсии рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{Сероконверсии} = \frac{N_i}{N} \cdot 100\%$$

, где

N_i – количество животных, давших положительный результат;

N – общее количество животных.

Определение иммуногенности комбинированных вакцин

Иммуногенную активность комбинированных вакцин оценивали в опытах на кроликах. Иммунизацию проводили двукратно в дозе 0,5 мл внутримышечно с интервалом 14 суток. Отбор сывороток осуществляли до иммунизации, перед второй иммунизацией и на 7 сутки после второй иммунизации.

Определение антител к полисахариду *H. influenzae* тип *b* проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-системы «Rabbit Anti-*Haemophilus influenzae* type *b* IgG ELISA Assay» («XpressBio»,

США) в соответствии с инструкцией по применению. В качестве положительного контроля использовали кроличью сыворотку, откалиброванную нами относительно международного стандарта Anti-Hib Human Reference Serum (NIBSC, 96/536) [187].

Определение антител к коклюшным антигенам, дифтерийному и столбнячному анатоксинам проводили методом ИФА с помощью тест-систем «ИФА Анти-Кок» и «ИФА Анти-ДС» («Биомед», Пермь) в соответствии с инструкцией по применению, с использованием коммерческого конъюгата анти-IgG кролика («SDT», Германия) в соответствии с инструкцией по применению.

Определение антител к поверхностному антигену вируса гепатита В проводили методом ИФА с помощью тест-системы «МикрАТ-НВs» («Имбио», Н-Новгород) в соответствии с инструкцией по применению.

Специфическая безопасность

Определение специфической безопасности активной фармацевтической субстанции и Hib-вакцины проводили на группе из 5 морских свинок массой (300 ± 50) г.

При определении специфической безопасности активной фармацевтической субстанции морским свинкам вводили препарат в пятикратной разовой дозе, рекомендуемой для человека (50 мкг PRP, 2,5 мл под кожу внутренней поверхности верхней трети бедра). Для проведения анализа субстанцию разводили стерильным раствором натрия хлорида 0,9 %.

При определении специфической безопасности Hib-вакцины морским свинкам вводили препарат в количестве, равном шести прививочным дозам для человека (60 мкг PRP, подкожно по 1,5 мл в бок и лапку). Для проведения анализа лиофилизированную Hib-вакцину разводили водой для инъекций.

Препарат считали безопасным, если через 21 сутки все животные оставались живыми, и в течение указанного периода у них не отмечалось

потери массы тела и симптомов столбнячной интоксикации (ригидность лапки, искривление позвоночника или сочетание указанных признаков).

2.4.4. Технологические методы

Розлив Нib-вакцины

Розлив препарата осуществляли в стерильные ампулы ШП-2 вместимостью 2 см³ по 0,5 мл на автоматической разливочной машине БОШ AVRF-0,4 на базе филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед».

Лиофильное высушивание Нib-вакцины

Лиофильное высушивание препарата проводили в сублимационной установке ТГ-50 (Германия) с номинальным объемом загрузки 50 л, площадью загрузки 3,8 м³ на базе филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» (см. раздел 4.2).

Герметизация ампул с Нib-вакциной

Запайку ампул с высушенным препаратом производили на машине для запайки ампул А6/FA «MACOFAR», которая оснащена цепным перемещением ампул в узлы запайки ампул, выгрузки.

Определение эвтектической температуры растворов

Определение проводили с помощью прибора мегаомметр с диапазоном измерения удельного сопротивления от 1 кОм до 500 МОм.

Установка для определения эвтектической температуры растворов препаратов представляла собой стеклянный стакан диаметром 40 мм и высотой 50 мм, в крышке которого стационарно закреплены два электрода, соединенные с мегаомметром, и расположенный между ними термопреобразователь сопротивления ТСП марки ТС 1388/4.

Эвтектическая температура (температура полного затвердевания раствора) определялась при удельном сопротивлении раствора равном 20 МОм [15].

2.4.5. Проведение валидации аналитических методик

Подтверждение пригодности методик для оценки качества активной фармацевтической субстанции, используемой для производства Нib-вакцины, и готовой лекарственной формы Нib-вакцины осуществляли в соответствии с требованиями отечественных и международных нормативных документов [1, 11, 21, 48, 60, 76, 110, 127].

В ходе проведения валидации в зависимости от типа методики устанавливали следующие аналитические характеристики:

1. Специфичность - характеризует способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце.

2. Правильность (точность) – характеризует степень соответствия между известным истинным значением или справочной величиной и значением, полученным по данной методике.

3. Линейность – характеризует степень пропорциональности полученных результатов по данной методике к концентрации (количеству) вещества в пробе.

4. Прецизионность - характеризует степень близости (или степень разброса) результатов для серии измерений однородного образца, выполненных по данной методике на различных пробах одного и того же образца в установленных условиях.

4.1. При оценке сходимости необходимо показать, что методика анализа при проведении в одинаковых условиях (в частности одним и тем же исполнителем, на одном оборудовании в короткий интервал времени) обеспечивает получение сравнимых результатов.

4.2. При оценке внутрилабораторной прецизионности должно быть показано, что аналитическая методика обеспечивает получение согласующихся результатов независимо от

изменений внешних факторов при условии однородности исследуемой пробы.

5. Диапазон применения – характеризует прецизионность и точность системы посредством анализа каждой из концентраций калибровочной кривой.

6. Предел количественного определения - характеризует минимальную концентрацию или количество анализируемого продукта, которое можно определить с приемлемой прецизионностью и точностью в заданных экспериментальных условиях.

7. Предел детектирования - характеризует минимальное количество анализируемого вещества, которое может быть обнаружено (не обязательно количественно).

2.4.6. Методы изучения общетоксических свойств

Определение «острой» и «хронической» токсичности Ніб-вакцины

Исследование общетоксических свойств Ніб-вакцины включали изучение «острой» и «хронической» токсичности. За основу дизайна доклинического исследования были взяты рекомендации действующих методических документов [8, 9, 26, 49, 50, 185]. Оценка препаратов проводилась с соблюдением этических правил гуманного отношения к животным.

Дозы для исследования Ніб-вакцины были рассчитаны по методике, изложенной в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [50] в пересчете на животное. Принимая во внимание, что исследуемая вакцина предназначена в первую очередь для иммунизации детей раннего возраста, дозы препарата для доклинических исследований рассчитаны на массу тела ребенка.

Из расчета 1 доза для ребенка – 0,5 мл/7,5 кг (66,7 мкл/1 кг) или 10 мкг/7,5 кг (1,33 мкг/1 кг).

Коэффициент пересчета доз для беспородной (б/п) мыши с массой тела 18 г – 2,9; коэффициент пересчета доз для кролика с массой тела 2500 г – 14,7.

Коэффициент пересчета доз для ребенка с массой тела 7,5 кг – 23.

Пример расчета 1 дозы для б/п мыши:

$$\frac{66,7 \text{ мкл/кг} \times 23}{2,9} = 529 \text{ мкл/кг} \text{ или } 10,55 \text{ мкг/кг} \text{ (то есть } 9,5 \text{ мкл/18 г или } 0,19$$

мкг/18 г)

1 доза для кролика - 260,9 мкл или 5,2 мкг

1 доза для мыши - 9,5 мкл или 0,19 мкг

В ходе экспериментов Нib-компонент, лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения, растворяли водой для инъекций.

Способ введения препарата определен по «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [49] и по «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [50].

Общетоксическое действие Нib-вакцины исследовали на б/п мышах. Исследования проведены на 180 животных, которые были разбиты на группы по 5 самцов и 5 самок в каждой.

При определении «острой» токсичности б/п мышам вводили Нib-вакцину внутривентрально однократно в двух дозах: 1,9 мкг (10 доз) и 19 мкг (100 доз) в объеме 0,5 мл.

При определении «хронической» токсичности Нib-вакцину вводили внутримышечно в двух дозах: 1,9 мкг (10 доз: по 1 дозе в 0,5 мл ежедневно в течение 10 дней) и 19 мкг (100 доз: по 10 доз в 0,5 мл ежедневно в течение 10 дней).

Животным контрольных групп вводили эквивалентный объем раствора натрия хлорида 0,9 %.

При проведении исследования «острой» и «хронической» токсичности после введения препаратов и раствора натрия хлорида 0,9 % за животными наблюдали в течение 14 суток. Ежедневной регистрации подлежали: гибель

животных, их масса, поведение и внешнее состояние, а также наличие клинических симптомов интоксикации. Были изучены следующие параметры указанными ниже методами:

Клинический осмотр - Клинический осмотр каждого животного проводился один раз до начала введения препарата и в течение первого дня после введения, в дальнейшем ежедневно. Выполнялся подробный осмотр животного в клетке содержания, в руках и на стандартной открытой площадке. Отмечалось проявление и выраженность симптомов интоксикации.

Определение массы тела – Все животные взвешивались перед введением препарата, ежедневно в течение всего периода исследования и перед запланированной эвтаназией.

Некропсия - Проводилась полная некропсия тел всех животных, подвергнутых запланированной эвтаназии. Был проведен макроосмотр органов.

При изучении «острой» и «хронической» токсичности животные опытных и контрольной групп были подвергнуты эвтаназии через 24 часа, 7 суток и 14 суток после окончания введения препарата.

Определение массы органов - У всех животных, подвергнутых запланированной эвтаназии, были взвешены и зафиксированы в формалине следующие органы: сердце, печень, легкие, селезенка, почки, тимус.

Вычисляли коэффициенты масс исследуемых органов (КМ) по формуле:

$$\frac{m_0}{m_{\text{ж}}} \times 100\%$$

, где:

m_0 - масса органа, г;

$m_{\text{ж}}$ - масса животного на момент эвтаназии, г

Определение местного раздражающего действия

Исследование местного раздражающего действия Нiв-вакцины проводили на кроликах массой 2,0-2,5 кг (4 кролика в возрасте 3-4 месяцев)

по модифицированному методу Драйза [49]. Исследуемый препарат в дозе 5,2 мкг (1 доза для ребенка в пересчете на кролика) вводили в один глаз кроликов, в другой глаз вводили эквивалентный объем контрольного препарата (раствора натрия хлорида 0,9%).

H₁b-вакцину наносили за веко правого глаза (опыт) кролика, раствор натрия хлорида 0,9 % наносили за веко левого глаза (контроль) кролика и придерживали веки закрытыми в течение 1 с. Реакция регистрировалась через 24, 48, 72 часа и 7 суток.

2.5. Методы статистической обработки результатов исследования

Статистический анализ результатов был проведен с использованием методов описательной статистики. В работе использовали электронные таблицы Excel для Windows (Microsoft).

Результаты, полученные при проведении иммуноферментного анализа, обрабатывались с помощью компьютерной программы «Паралайн», разработанной в ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России, которая прошла тестирование в Национальном Институте Биологических Стандартов (Англия) и в Европейском Центре ВОЗ (Дания).

Результаты, полученные при проведении экспериментального (доклинического) исследования H₁b-вакцины в опытах на животных, обрабатывались с использованием электронных таблиц Excel для Windows (Microsoft). Достоверность различий между группами оценивали с применением t-критерия Стьюдента. Гипотезу о нормальности распределения проверяли с помощью программного обеспечения «Minitab16».

ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ПОЛИРИБОЗИЛРИБИТОЛА ФОСФАТА, КОНЬЮГИРОВАННОГО С БЕЛКОМ-НОСИТЕЛЕМ СТОЛБНЯЧНЫМ АНАТОКСИНОМ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

С целью гарантии качества готового вакцинного препарата фармацевтические субстанции, используемые для его производства и являющиеся его активным ингредиентом, должны проходить строжайший контроль на всех этапах производственного цикла.

Настоящая глава посвящена исследованиям, направленным на разработку методов контроля субстанции Нib. Представлены результаты валидационных исследований, подтверждающие пригодность предложенных методов контроля. Кроме того, была проведена оценка качества субстанции Нib в соответствии с требованиями отечественных и международных нормативных документов [24, 99, 181, 188].

3.1. Разработка методики анализа субстанции Нib по показателю «Посторонние примеси» и ее валидация²

Технология производства активной фармацевтической субстанции Нib предусматривает использование разнообразных химических реагентов и растворителей, в частности ЭДТА, ДМСО и НЭМ, содержание которых в готовой субстанции должно быть минимальным. Одним из наиболее часто используемых способов определения содержания посторонних примесей и остаточных органических растворителей в фармацевтических субстанциях является метод ЯМР. Возможность анализировать одновременно несколько примесей является преимуществом этого метода, однако зачастую требуется специальная подготовка анализируемого образца, а стоимость самого анализа

² Работа выполнена совместно с сотрудниками отдела инновационных проектов «НПО «Микроген» в г. Москва.

очень высока. Кроме того, не каждая аналитическая лаборатория может быть оснащена таким дорогостоящим оборудованием. Наибольшей трудностью выявления примесей является то, что они имеют различную химическую природу, что приводит к использованию целого ряда разнородных аналитических методов, значительно увеличивающих время анализа и парк используемой аналитической техники. Разработка универсального аналитического метода, позволяющего количественно идентифицировать одновременно за время одного анализа остаточные реагенты, использующиеся в производстве субстанции Ніб, весьма актуальна.

Одним из методов, позволяющих количественно идентифицировать примеси, обладающие сильно различающимися физико-химическими свойствами, является метод ОФ-ВЭЖХ с детектированием в ультрафиолетовой области спектра. В связи с этим следующим этапом исследований являлась разработка простой в исполнении методики ОФ-ВЭЖХ, обладающей высокой чувствительностью и позволяющей во время одного анализа проводить определение ЭДТА, ДМСО и НЭМ.

Установленное производителем допустимое содержание примесей ЭДТА, ДМСО и НЭМ в субстанции Ніб приведено в таблице 5.

Таблица 5

Показатели содержания посторонних примесей в субстанции Ніб

Посторонние примеси	Требования проекта НД	Результаты анализа серии субстанции методом ¹ Н ЯМР
НЭМ	не более 1,0 м.д. ³	не обнаружен
ЭДТА	не более 3,4 м.д.	менее 3,4 м.д.
ДМСО	не более 1,4 м.д.	менее 1,4 м.д.

Первоначально были определены условия спектрофотометрического детектирования исследуемых примесей. Для этого были установлены максимумы поглощения водных растворов ЭДТА, ДМСО и НЭМ в

³ Единица концентрации, одна миллионная доля. Соответствует количеству вещества в мг на 1 кг (или мкг в 1 г). В ГФ XIII обозначение «ррт» (частей на миллион) подразумевает массовое соотношение. Приблизительное, но наиболее часто используемое определение - количество мг в 1 л (или мкг в 1 мл).

предельно допустимых концентрациях (ПДК), равных 3,4 мкг/мл, 1,4 мкг/мл и 1,0 мкг/мл соответственно.

На основании результатов, представленных на рисунке 6 а и б, идентификацию ДМСО и НЭМ проводили при длине волны 210 нм.

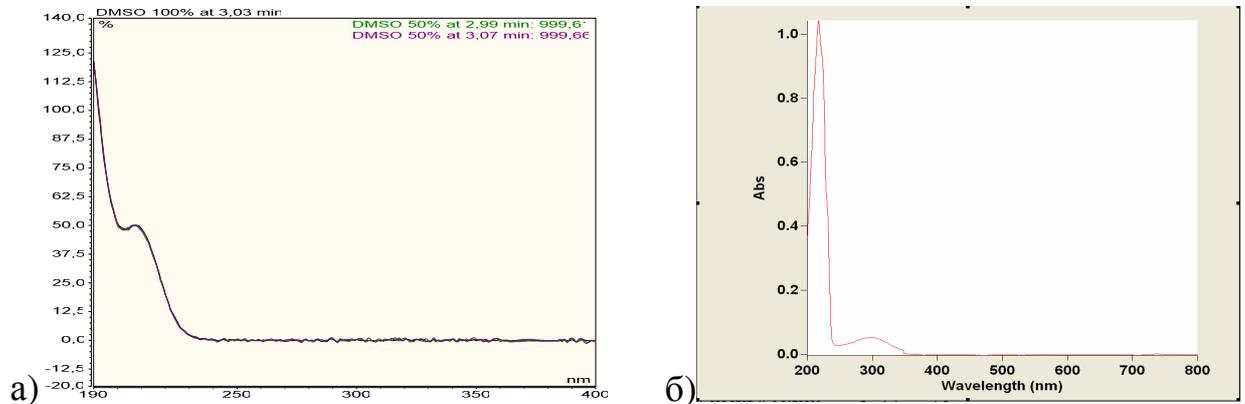


Рис. 6. Спектры поглощения растворов: а - ДМСО с максимумом 210 нм; б - НЭМ с максимумом 217-218 нм.

Молекула ЭДТА не содержит каких-либо хромофорных групп, поэтому его спектрофотометрическое определение в образцах различной природы (фармацевтические лекарственные формы, питьевая вода, соусы, майонез, белые вина, безалкогольные напитки и т.д.) основано на образовании соответствующих производных соединений, поглощающих в УФ-свете, например, с солями меди или железа [37, 59].

Для спектрофотометрической регистрации ЭДТА получали комплексное соединение ЭДТА и CuSO_4 , максимум поглощения которого составил 245 нм.

С целью подтверждения образования комплекса были сняты спектры поглощения водных растворов ЭДТА, CuSO_4 и комплекса CuЭДТА .

В сравнении с контрольными растворами ЭДТА и CuSO_4 показано, что ЭДТА образует комплекс с катионами меди с максимумом поглощения около 250 нм (рис. 7 в). Растворы ЭДТА и CuSO_4 не имеют максимумов в данном диапазоне, их поглощение растет в сторону 190 нм (рис. 7а и 7б).

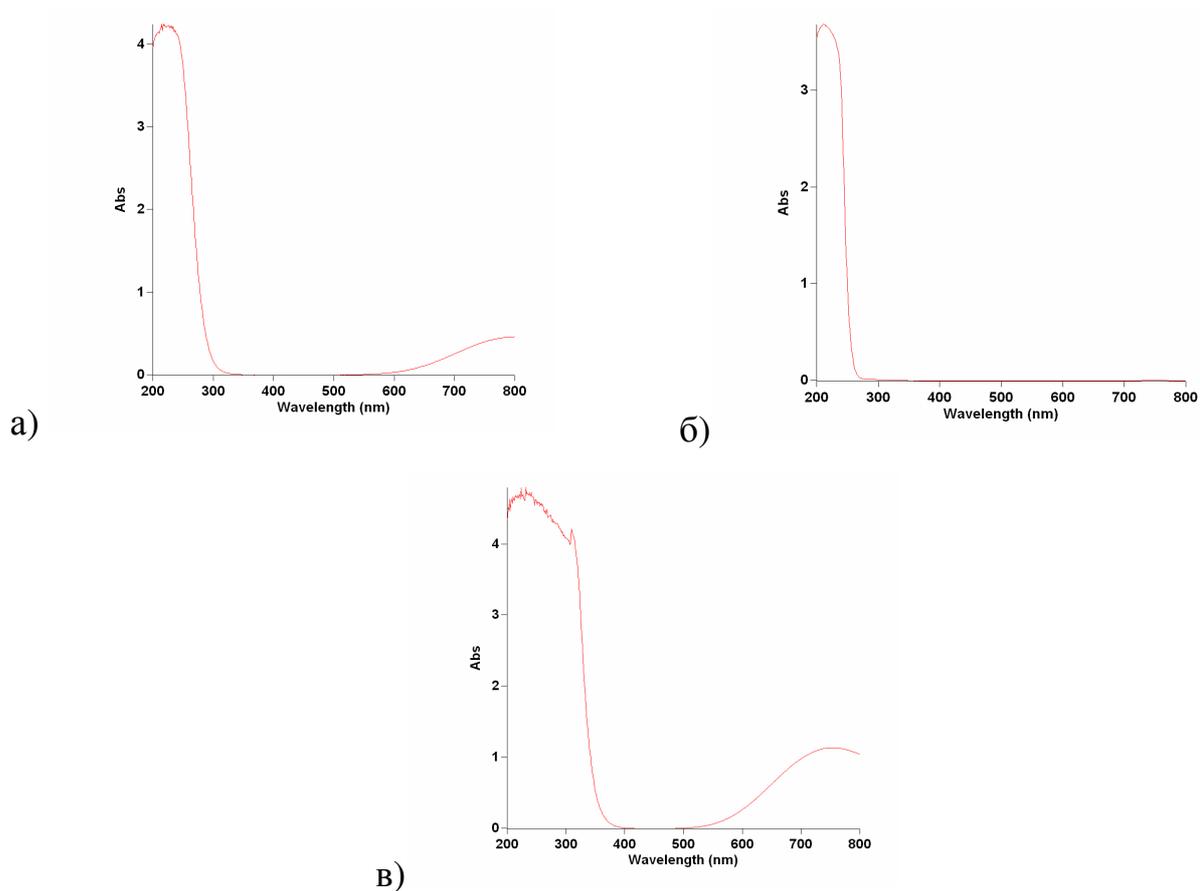


Рис. 7. Спектры поглощения растворов: а - CuSO_4 с максимумом, стремящимся к 200 нм; б - ЭДТА с максимумом, стремящимся к 200 нм; комплекса CuЭДТА (соотношение 3:1) с максимумом 250 нм.

Достаточную для комплексообразования с ЭДТА концентрацию CuSO_4 устанавливали, варьируя в диапазоне 10:1-1:3 молярное соотношение ЭДТА (раствор 3,4 мкг/мл, или 12 мкМ) и CuSO_4 (концентрации 1,2-36 мкМ). Показано, что площадь хроматографического пика комплекса стабилизируется при молярном соотношении 1:1, т.е. концентрации CuSO_4 12 мкМ достаточно для связывания всего присутствующего в растворе ЭДТА при его концентрации, соответствующей ПДК (рис. 8).

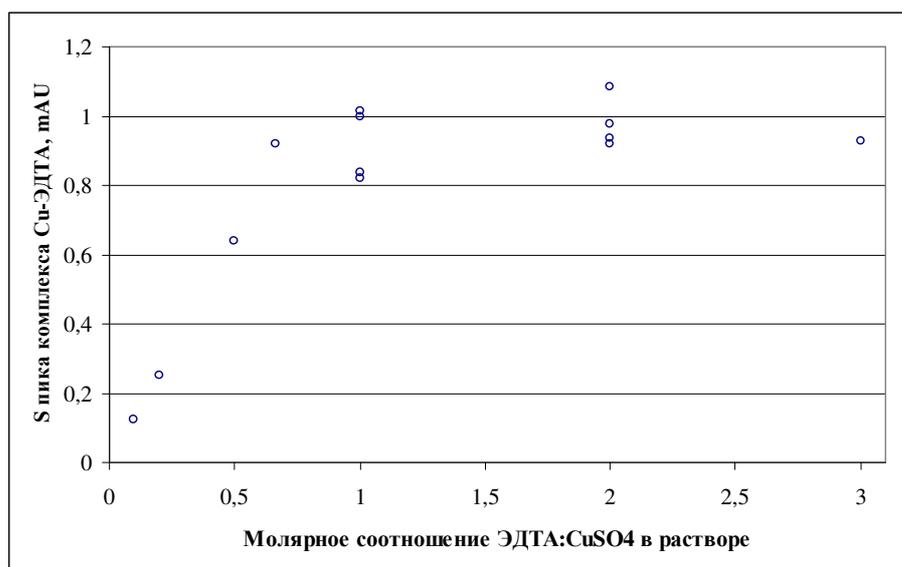


Рис. 8. Зависимость площади пика комплекса CuЭДТА от молярного соотношения ЭДТА и CuSO₄ в растворе.

На основании полученных результатов в дальнейшей работе идентификацию комплекса CuЭДТА проводили при длине волны 245 нм, совместную идентификацию ДМСО и НЭМ при 210 нм.

Предварительные эксперименты по отработке методики проводили с использованием простой модификации метода ОФ-ВЭЖХ. В качестве ПФ применяли 14 мМ раствор Н₃РО₄ (рН 2,1) со скоростью потока 1 мл/мин; температуру колоночного отделения поддерживали в пределах 35±1°С; сигнал детектировали при 210 и 245 нм. Тестирование методики проводили на аналитических колонках, заполненных обращенно-фазовым носителем, содержащим привитую фазу С18.

Поскольку характеристики удерживания и селективности обращенно-фазовых сорбентов разных производителей отличаются друг от друга, на следующем этапе исследования был проведен сравнительный анализ нескольких аналитических колонок. При этом, выбор аналитической колонки был основан на способности селективно разделять наиболее близко элюирующие вещества CuЭДТА и ДМСО. Для каждой колонки был рассчитан фактор разрешения пиков R_s (табл. 6).

Разрешение пиков CuЭДТА и ДМСО рассчитывали с помощью программы сбора и обработки хроматографических данных LabSolution по формуле:

$$R_s = 2 \frac{R_{t_{i+1}} - R_{t_i}}{W_i + W_{i+1}} \quad (1)$$

R_{t_i} и $R_{t_{i+1}}$ – времена удерживания пиков разделяемых компонентов, мин;

W_i и W_{i+1} – ширина пиков разделяемых компонентов на половине высоты.

Таблица 6

Сравнительный анализ разрешения пиков ДМСО и CuЭДТА на аналитических колонках C18

Наименование колонки C18	$R_{t_{\text{ДМСО}}}$	$R_{t_{\text{CuЭДТА}}}$	$W_{\text{ДМСО}}$	$W_{\text{CuЭДТА}}$	R_s
Kromasil AkzoNobel 100-5C18 150 x 4,6 мм, 5 мкм	2,726	2,185	0,184	0,116	3,60
Hydrosphere YMC C18 150x4,6 мм, 3 мкм, 120 Å	3,030	3,580	0,150	0,177	3,30
YMC-Pack ODS-A 150x4,6 мм, 3 мкм, 300 Å	2,939	2,614	0,150	0,180	1,97

Колонка производства AkzoNobel показала максимальную селективность и эффективность в ряду протестированных аналитических колонок с обращенной фазой C18. Для нее разрешение пиков превысило аналогичный показатель для других колонок (табл. 6, рис. 9).

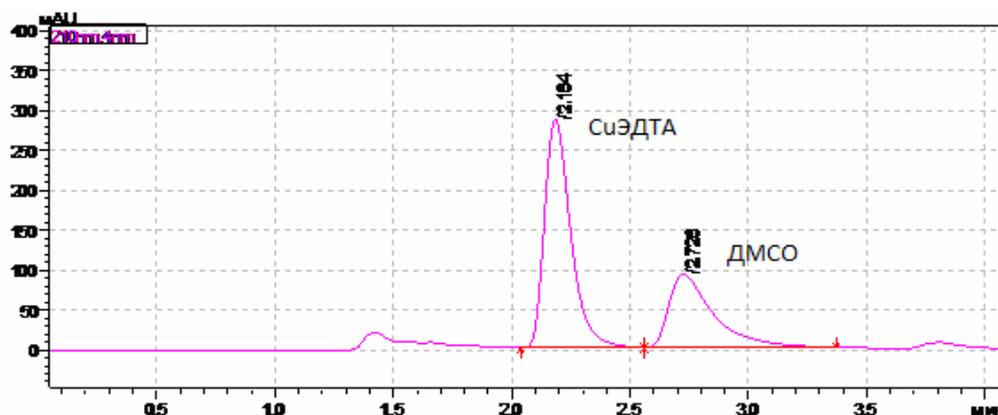


Рис. 9. Разделение пиков CuЭДТА и ДМСО на колонке Kromasil ($R_{t_{\text{CuЭДТА}}}$ – 2,184 мин, $R_{t_{\text{ДМСО}}}$ – 2,726 мин).

В указанных условиях проводили хроматографию раствора НЭМ. Его время удерживания составило около 23 минут (рис. 10)

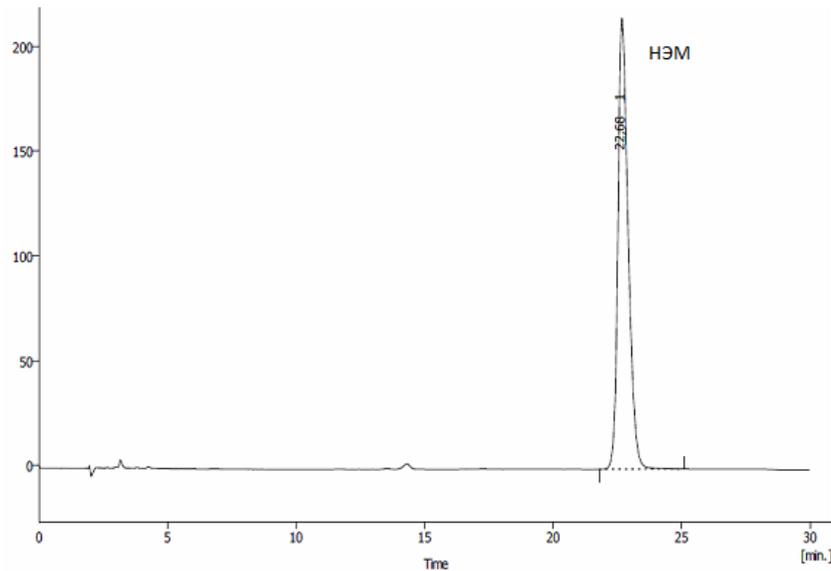


Рис. 10. Хроматографический профиль раствора НЭМ 1,0 мкг/мл в изократическом режиме элюирования на колонке Kromasil.

Как известно, увеличивая силу элюента, повышая содержание органики в ПФ, в обращенно-фазовой хроматографии можно управлять удерживанием образца. Введение в ПФ ацетонитрила в количестве, достигающем 30% (табл. 7), привело к уменьшению времени удерживания НЭМ с 23 до 5 минут и позволило сократить анализ практически в 2 раза - с 30 до 17 минут (рис. 11).

Таблица 7

Программа градиентного элюирования

Минуты	0,0	1,0	1,0	5,0	9,0	11,0	17,0
H ₃ PO ₄	100%	100%	70%	70%	20%	100%	100%
Ацетонитрил			30%	30%	80%		

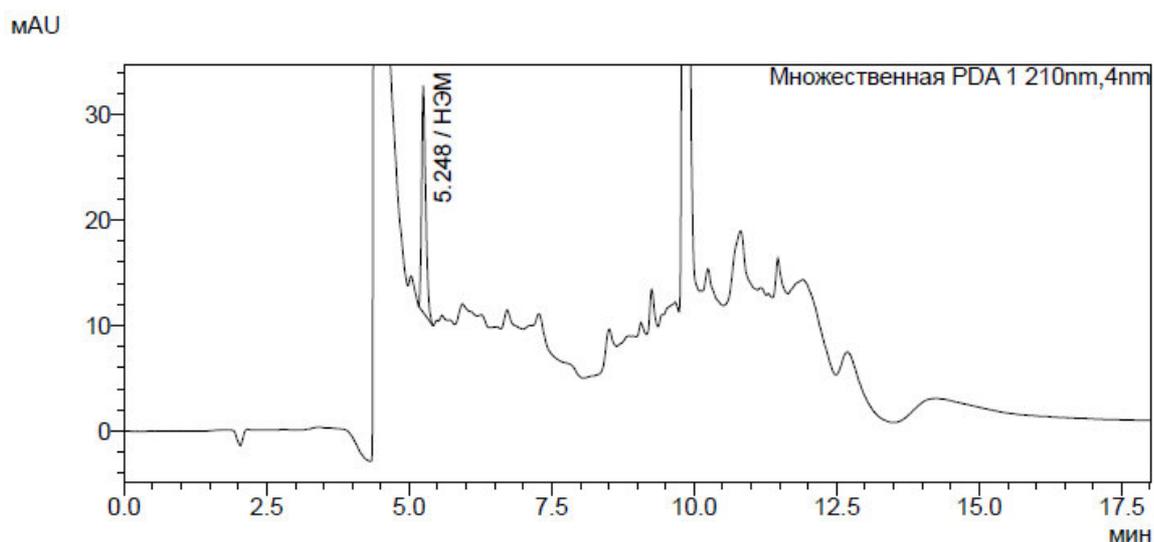


Рис. 11. Хроматографический профиль раствора НЭМ 1,0 мкг/мл в режиме градиентного элюирования на колонке Kromasil.

Таким образом, была показана возможность применения предложенного метода для идентификации исследуемых примесей (ЭДТА в форме комплекса с катионами меди, ДМСО и НЭМ) на аналитической колонке Kromasil 100-5C18.

В ходе отработки метода были установлены критерии пригодности хроматографической системы:

1. Фактор асимметрии, T от 0,8 до 1,5;
2. Разрешение между пиками, $R_s \geq 1,5$
3. Число теоретических тарелок, $N \geq 1000$

Тест на проверку пригодности хроматографической системы проводили с использованием модельного раствора субстанции NiB с примесями ЭДТА, ДМСО и НЭМ в концентрациях, соответствующих их ПДК в субстанции. Анализ проводили в трех повторах в приведенных выше условиях. Показатели R_s , N и T были рассчитаны с помощью программы сбора и обработки хроматографических данных LabSolution по формулам 1 (стр. 67), 2 и 3:

$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{Rt_i}{W05_i} \right)^2 \quad (2)$$

$$T = \frac{b_i}{a_i} \quad (3)$$

где N - число теоретических тарелок;

R_{ti} – время удерживания компонента, мин;

$W05_i$ – ширина пика на половине его высоты;

T - фактор асимметрии пика;

a_i – левая полуширина пика на 10% высоты;

b_i – правая полуширина пика на 10% высоты.

Результаты представлены в таблице 8 и на рисунке 12.

Таблица 8

Результаты проверки пригодности хроматографической системы

Наименование примеси в модельном растворе	T	R_s	N
СuЭДТА	0,86	1,60	1038
ДМСО	2,00	2,89	2507
НЭМ	1,31	3,17	19461

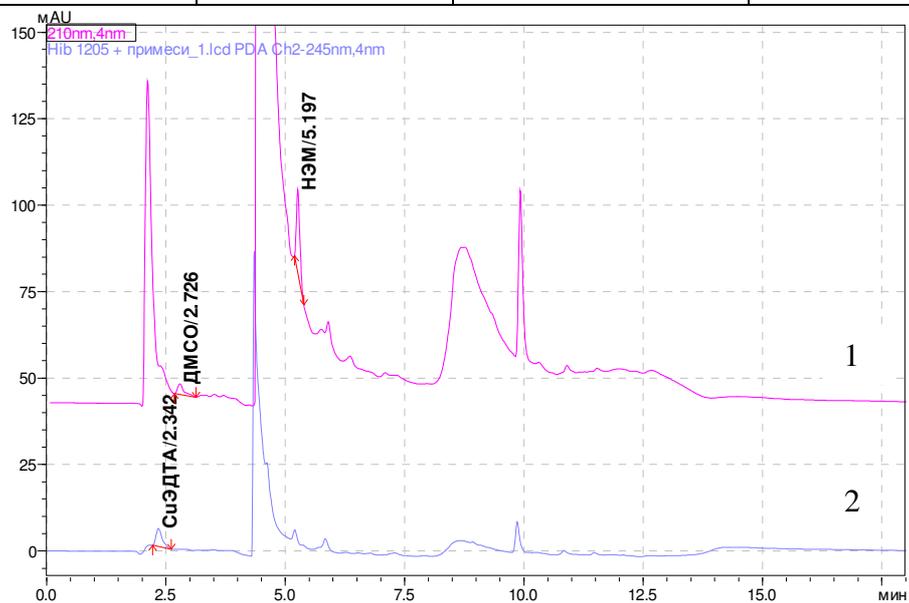


Рис. 12. Хроматографический профиль раствора для проверки пригодности хроматографической системы (R_t СuЭДТА 2,342 мин, R_t ДМСО 2,726 мин, R_t НЭМ 5,197 мин), 1 - детектирование при 210 нм; 2 - детектирование при 245 нм.

Валидацию методики проводили согласно требованиям отечественных и международных руководств по валидации методов анализа [1, 11, 21, 48, 60, 76, 110, 127]. Были исследованы следующие характеристики: специфичность и предел детектирования.

Исследование специфичности проводили с целью подтверждения способности метода однозначно оценивать исследуемые примеси на фоне компонентов, присутствующих в составе субстанции Ніб.

Специфичность метода оценивали с использованием следующих модельных растворов:

1. Раствор плацебо (раствор, содержащий все компоненты субстанции, кроме активного компонента) следующего состава: натрия хлорид 7,9 мг/мл, натрия дигидрофосфат дигидрат 1,4 мг/мл, натрия дигидрофосфат моногидрат 1,24 мг/мл, динатрия гидрофосфат 0,99 мг/мл;
2. Модельный раствор примесей ЭДТА, ДМСО и НЭМ в ПДК;
3. Модельный раствор субстанции Ніб и комплексообразователя (субстанция Ніб и раствор CuSO_4 12 мкМ в соотношении 99:1);
4. Модельный раствор субстанции Ніб с примесью ЭДТА (субстанция Ніб и раствор комплекса CuЭДТА , где ЭДТА 3,4 мкг/мл, меди (II) сульфата 12 мкМ, в соотношении 99:1);
5. Модельный раствор субстанции Ніб с примесью ДМСО (субстанция Ніб и раствор диметилсульфоксида 1,4 мкг/мл в соотношении 99:1);
6. Модельный раствор субстанции Ніб с примесью НЭМ (субстанция Ніб и раствор N-Этилмалеимида 100 мкг/мл в соотношении 99:1).

Для приготовления модельных растворов использовали субстанцию Ніб серии 53IFA1205. Анализ каждого раствора проводили в трех повторах.

Хроматографический профиль субстанции Ніб представлен двумя пиками: солевые компоненты субстанции элюируют со временем

удерживания 2,0 мин и белковый компонент, который элюирует при содержании в подвижной фазе 30% ацетонитрила, R_t 4,35 мин (рис 13б).

Анализ хроматографических профилей растворов плацебо, субстанции *Hib* и раствора смеси примесей показал, что компоненты субстанции не дают каких-либо интерферирующих сигналов в зоне элюции CuЭДТА, ДМСО и НЭМ (рис 13). Введение в состав исследуемой субстанции комплексообразователя CuSO_4 не оказывало влияния на хроматографическое разделение субстанции и не приводило к появлению дополнительных пиков (рис. 13в).

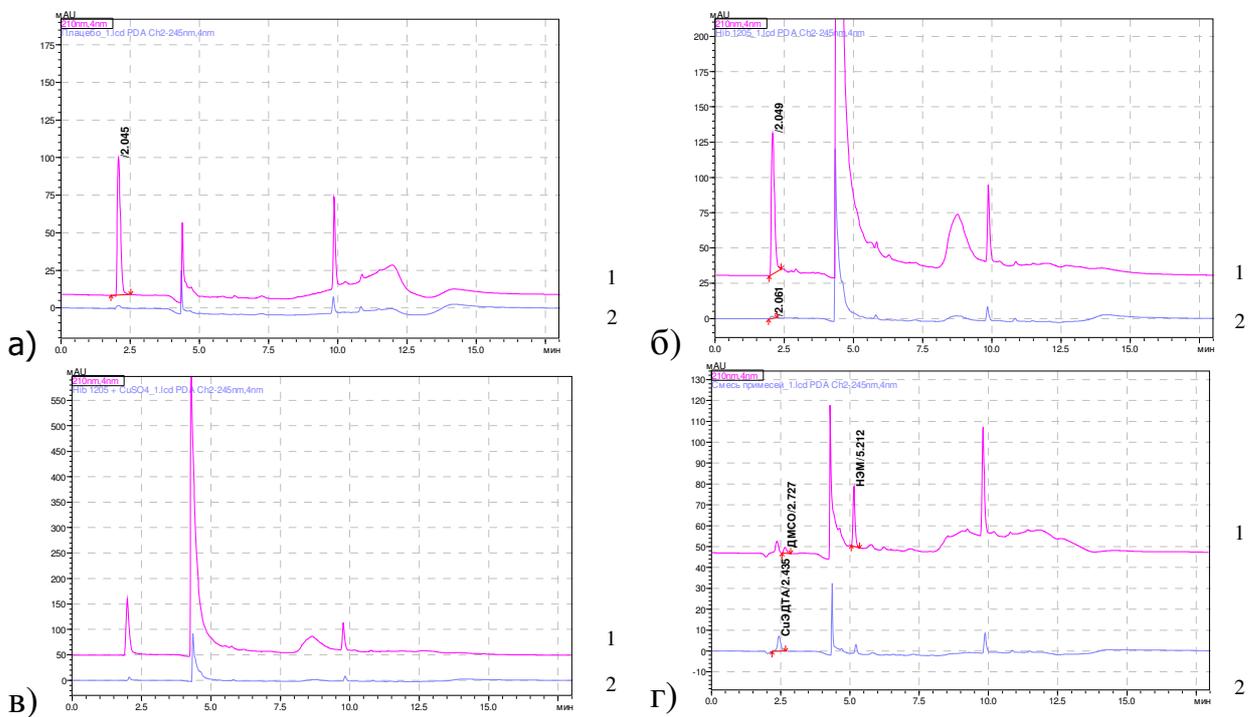


Рис. 13. Типичные хроматограммы растворов для оценки специфичности метода: а – раствор плацебо R_t 2,046 мин; б - субстанция *Hib* R_t 2,049 и 4,35 мин; в - субстанция *Hib* с добавлением 12 мкМ CuSO_4 ; г – раствор примесей ЭДТА, ДМСО и НЭМ в ПДК R_t CuЭДТА 2,435 мин, R_t ДМСО 2,727 мин, R_t НЭМ 5,212 мин; 1 - детектирование при 210нм; 2 - детектирование при 245нм.

Анализ данных, полученных при хроматографии модельных растворов субстанции *Hib* с примесями, показал, что с помощью разработанной методики достигается требуемая степень разделения исследуемой примеси от

компонентов субстанции Ніб. Разрешение между соседними пиками составляло $\geq 1,5$. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9

Результаты оценки специфичности метода определения примесей

Наименование модельного раствора	№ п./п.	R_t , мин	$\overline{R_t}$, мин	R_t соседнего пика, мин	R_s	$\overline{R_s}$
Ніб 1205 + НЭМ	1	5,190	5,191 RSD 0,2%	4,355	4,232	4,137 RSD 1,9%
	2	5,202		4,367	4,089	
	3	5,182		4,346	4,090	
Ніб 1205 + ДМСО	1	2,728	2,723 RSD 0,2%	2,048	3,272	3,168 RSD 2,8%
	2	2,718		2,038	3,122	
	3	2,723		2,043	3,110	
Ніб 1205 + CuЭДТА	1	2,351	2,354 RSD 0,2%	2,045	1,651	1,653 RSD 1,3%
	2	2,358		2,048	1,676	
	3	2,352		2,043	1,633	

Примечание: R_t – время удерживания примеси, $\overline{R_t}$ – среднее значение времени удерживания примеси, R_s – фактор разрешения пиков, $\overline{R_s}$ – среднее значение фактора разрешения.

Для определения предела детектирования были проанализированы модельные растворы субстанции Ніб с CuЭДТА, ДМСО и НЭМ в концентрациях каждой примеси 0,05, 0,1 и 0,25 % от содержания активного компонента субстанции. Анализ каждого испытуемого раствора проводили в трех повторах. Для каждой примеси рассчитывали соотношение сигнал/шум - показатель, равный отношению сигнала S (высота пика) определяемого вещества к усредненной на определенном временном отрезке амплитуде базового шумового сигнала N. За диапазон определения базового шумового сигнала был принят интервал 0,5-1,0 минута. Предел детектирования (LOD) определяли как наименьшую концентрацию примеси, для которой соотношение сигнал/шум составляло 3:1.

Результаты определения предела детектирования метода для CuЭДТА, ДМСО и НЭМ представлены в таблице 10

Результаты определения предела детектирования примесей

Наименование примеси	Концентрация, %	Содержание примеси, нг	\bar{H} пика примеси, мAu (n=5)	S/N	LOD примеси
CuЭДТА	0,05	19,2	835,20	64,03	≈ 0,85 нг
	0,1	38,4	1760,40	136,51	
	0,25	96,0	4988,80	349,94	
ДМСО	0,05	19,2	1558,00	96,90	≈ 0,56 нг
	0,1	38,4	3292,80	219,43	
	0,25	96,0	7487,80	490,42	
НЭМ	0,05	19,2	12764,60	793,01	≈ 0,05 нг
	0,1	38,4	44769,60	2983,45	
	0,25	96,0	99679,60	6528,66	

Примечание: \bar{H} - среднее значение высоты пика, S/N – соотношение сигнал/шум, LOD - предел детектирования.

Из представленных результатов следует, что чувствительность метода ОФ-ВЭЖХ достаточна для детектирования 0,85 нг ЭДТА в форме комплекса с катионами меди, 0,56 нг ДМСО и 0,05 нг НЭМ.

Основные валидационные характеристики метода представлены в таблице 11.

Таблица 11

Основные валидационные характеристики
метода определения примесей

Аналитическая характеристика		Результаты
Специфичность		Разрешение между пиками субстанции NiB и примесями ЭДТА, ДМСО и НЭМ > 1,5
Предел детектирования	ЭДТА	0,85 нг
	ДМСО	0,56 нг
	НЭМ	0,05 нг

Исследуемые серии субстанции NiB были проанализированы на наличие примесей НЭМ, ДМСО и ЭДТА. Для проведения анализа согласно предложенной методике в исследуемые серии субстанции NiB вносили раствор CuSO₄ до достижения конечной концентрации CuSO₄ 12 мкМ в

соотношении 100:1, тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре для формирования комплекса в случае присутствия в субстанции ЭДТА. Наличие исследуемых примесей в образцах субстанции регистрировали путем детекции пиков CuЭДТА, ДМСО и НЭМ (время удерживания 2,3, 2,7 и 5,2 соответственно) на хроматограмме субстанции.

Исследуемые серии субстанции Нib не содержали пиков, соответствующих по времени удерживания пикам ЭДТА, ДМСО и НЭМ, что свидетельствует об отсутствии данных примесей в субстанции Нib (табл. 12).

Таблица 12

Результаты определения примесей и остаточных органических растворителей в исследуемых сериях субстанции Нib

		Серии субстанции Нib			
		53IFA1110	53IFA1205	53IFA1210	53IFA1407
Результаты, полученные методом ОФ-ВЭЖХ	ЭДТА	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	ДМСО	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	НЭМ	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Результаты производителя субстанции (Heber Biotech), полученные методом ЯМР	ЭДТА	Не обнаружен	< 3,4 ppm	< 3,4 ppm	< 3,4 ppm
	ДМСО	< 1,4 ppm	< 1,4 ppm	< 1,4 ppm	< 1,4 ppm
	НЭМ	< 1,0 ppm	< 1,0 ppm	< 1,0 ppm	< 1,0 ppm

Таким образом, в ходе совместной работы с сотрудниками отдела инновационных проектов «НПО «Микроген» в г. Москва была разработана универсальная методика определения ЭДТА, ДМСО и НЭМ в субстанции Нib на основе метода ОФ-ВЭЖХ. Определение таких различных по своей химической природе веществ с помощью данного метода проводится во время одного анализа, продолжительность которого составляет 17 минут. Высокая чувствительность методики позволяет проводить определение примесей в количествах в несколько раз ниже предельно допустимого

содержания, установленного производителем. Разработанная методика является простой, не требует большого расхода дорогостоящей субстанции и может быть воспроизведена в любой аналитической лаборатории со стандартным оснащением⁴.

3.2. Разработка методики анализа субстанции Нib по показателю «Распределение по размеру молекул» и ее валидация

Характеристика молекулярного размера конъюгата PRP-ТТ методом эксклюзионной ВЭЖХ основана на определении коэффициента распределения вещества в порах сорбента при детектировании в ультрафиолетовой области спектра [71, 136, 170].

При разработке методики оценки молекулярных параметров субстанции Нib за основу были взяты работы следующих авторов:

1. Mario Landys Chovel Cuervo с соавторами по изучению взаимосвязи между физико-химическими и биологическими характеристиками синтетической конъюгированной Нib вакцины [164];
2. Jérôme Thiébaud с соавторами по разработке метода ВЭЖХ для определения молекулярных параметров полисахаридов *Haemophilus influenzae* тип *b* и конъюгатов [93].

Хроматографию проводили на аналитической колонке TSK-Gel G5000PWx1 7,8x300 мм, снабженной предколонкой TSK-Gel PWx1, производства компании Tosoh (Япония).

⁴ Материал опубликован в статье: Белякова, О.В. Разработка способа определения примесей этилендиаминтетрауксусной кислоты, диметилсульфоксида и N-этилмалеимида методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в фармацевтических субстанциях / О.В. Белякова, В.Н. Купцов, И.С. Ефимова, А.В. Иванов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 120-летию филиала АО НПО «Микроген» в г. Пермь Пермского Научно-производственного объединения «Биомед». – Пермь, 2018. – С. 37-44.

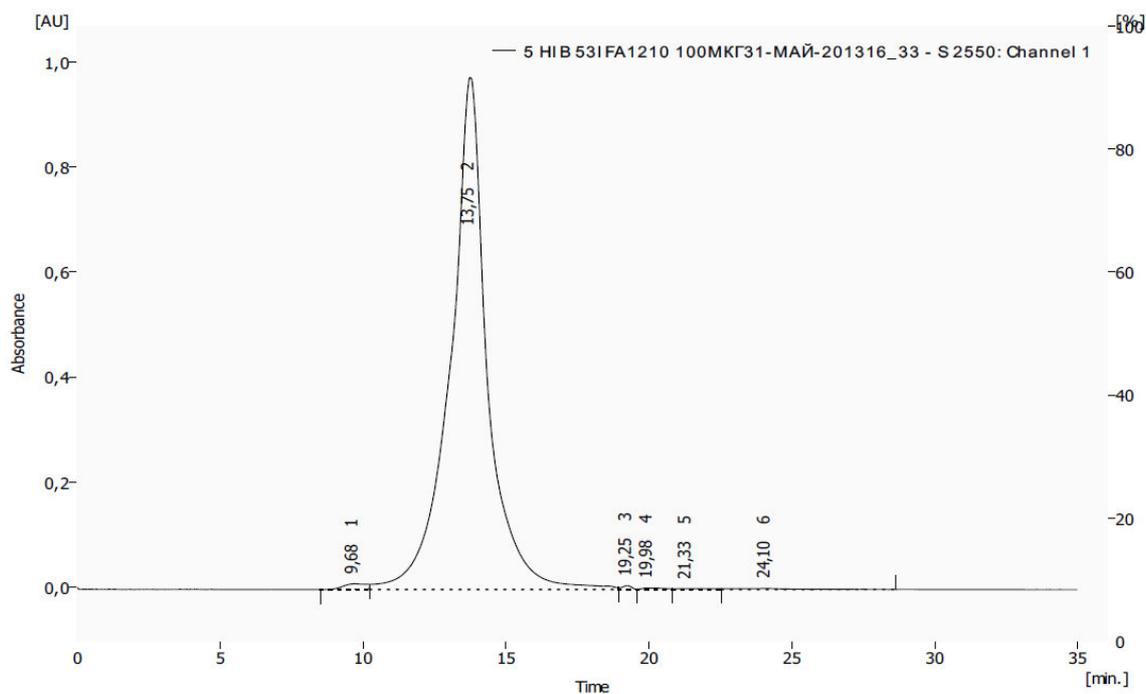


Рис. 14. Типичный хроматографический профиль
 субстанции Hib R_t 13,75 мин.

Коэффициент распределения (K_d) рассчитывали по следующей формуле:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (4)$$

где V_0 – свободный объем колонки;

V_e – объем элюции субстанции Hib;

V_t - полный объем колонки.

Свободный объем и полный объем колонки определяли с помощью высокомолекулярной ДНК (Deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon testes, Sigma, кат.№ D1626-1G) и раствора натрия азида 0,05% соответственно.

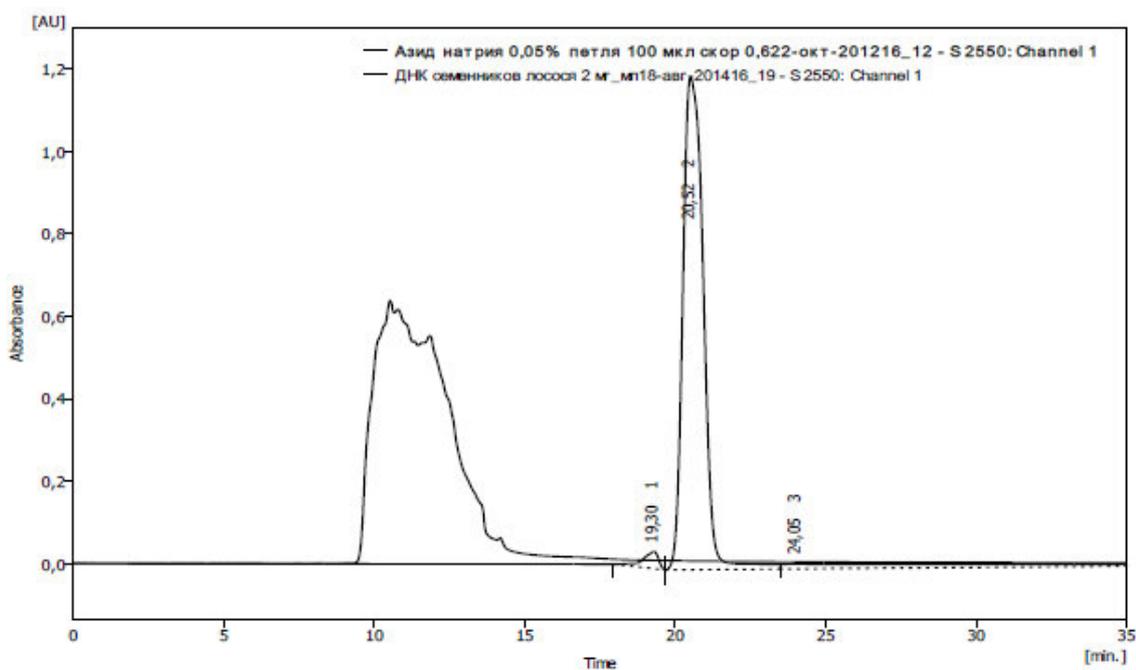


Рис. 15. Хроматографический профиль высокомолекулярной ДНК (R_t 10,52 мин) и раствора натрия азида 0,05% (R_t 20,52 мин) для определения свободного и полного объема колонки.

Свободный объем колонки составил 6,3 мл, полный объем – 12,3 мл.

Для доказательства пригодности аналитической системы были выбраны следующие параметры: число теоретических тарелок (N), фактор асимметрии пика (T) и относительное стандартное отклонение для площади пика (RSD_S). Во время предварительных исследований методики были установлены граничные значения указанных параметров:

1. $N \geq 3000$;
2. T не менее 0,8 и не более 1,7;
3. $RSD_S \leq 2\%$.

Тест на проверку пригодности хроматографической системы проводили с использованием раствора натрия азида 0,05%. Анализ выполняли в трех повторах в приведенных выше условиях. Показатели N , T и RSD_S были рассчитаны с помощью программы сбора и обработки хроматографических данных Clarity Chrom по формулам 2, 3 (стр. 69) и 5:

$$S, \% = \frac{A_i}{\sum A_i} \cdot 100 \quad (5)$$

где S – площадь пика, %;

A_i – площадь пика, mAU.s.

Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13

Результаты проверки пригодности хроматографической системы

№	N	Норма	T	Норма	$S, \%$	$RSD_s, \%$	Норма
1	4139	≥ 3000	1,079	0,8 – 1,7	98,3	0,72	$\leq 2\%$.
2	3782		1,132		98,8		
3	3585		1,516		97,4		

Хроматографические характеристики, полученные в результате обработки данных анализа трех последовательных инъекций раствора натрия азида 0,05%, соответствовали установленным граничным значениям, что свидетельствовало о пригодности хроматографической системы.

Валидацию методики проводили по следующим показателям: специфичность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность).

Исследование специфичности проводили с целью подтверждения способности метода однозначно определять анализируемый компонент в присутствии других компонентов пробы, обладающих различной молекулярной массой. В частности, необходимо было показать способность хроматографической методики дифференцировать столбнячный анатоксин, субстанцию Ніб и полисахарид полирибозилрибитола фосфат.

Для оценки специфичности метода последовательно анализировали следующие образцы:

1. Стандартный образец GF Ніб 06-0810, который представляет собой синтетический полирибозилрибитола фосфат, конъюгированный со столбнячным анатоксином (PRP-ТТ), в фосфатном буферном растворе (ЦГИБ, Куба);

2. Очищенный концентрированный столбнячный анатоксин (ОКСА) с. 979 (филиал АО НПО «Микроген» Пермское НПО «Биомед»);

3. Международный стандарт ВОЗ. Полисахарид *Haemophilus influenzae* тип *b* полирибозилрибитола фосфат (PRP), NIBSC code 02/208.

Анализ проводили в приведенных выше условиях, в трех повторах для каждого образца. Полученные результаты представлены на рисунке 16 и в таблице 14.

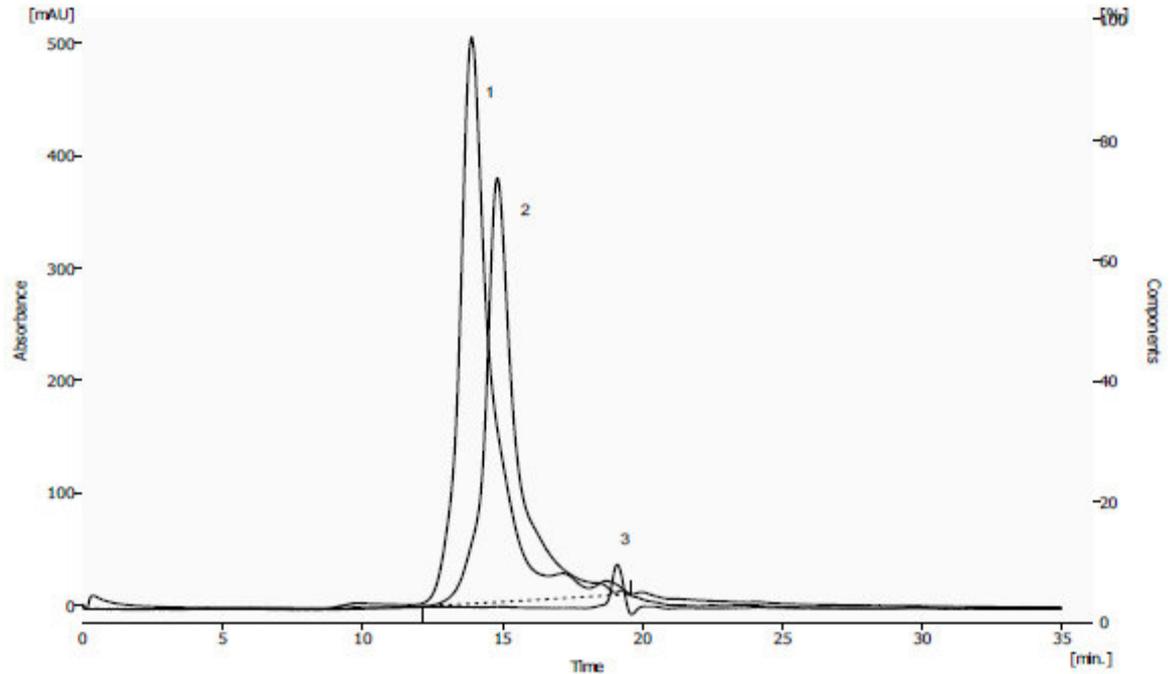


Рис. 16. Хроматографический профиль исследуемых образцов: 1 - Стандартный образец GF Hib 06-0810 R_t 13,90 мин.; 2 - ОКСА с. 979 R_t 14,82 мин.; 3 - Международный стандарт ВОЗ, 02/208 R_t 19,10 мин.

Таблица 14

Оценка специфичности методики анализа субстанции Hib по показателю «Распределение по размеру молекул»

№	Образец	R_t , мин	V_e , мл	Kd
1	GF Hib 06-0810	13,90	8,34	0,39
2	ОКСА с. 979	14,82	8,89	0,48
3	Стандарт PRP, 02/208 (NIBSC, UK)	19,10	11,46	0,88

Результаты показали, что стандартный образец GF Hib 06-0810, столбнячный анатоксин и стандарт PRP в данных условиях проведения анализа имели различное время удерживания, что свидетельствовало о специфичности методики.

Для определения сходимости метода проводили шесть последовательных анализов одной серии субстанции Ніб и рассчитывали величину RSD для времени удерживания, процента площади пика основного вещества и константы распределения основного вещества.

RSD для 6 определений при оценке сходимости не должно превышать 2%.

Полученные при оценке сходимости данные показали, что RSD результатов определения времени удерживания, процента площади пика и константы распределения основного вещества составляло от 0,11 до 0,919 % и не превышало 2 %, что свидетельствовало о точности методики. Результаты определения сходимости метода представлены в таблице 15.

Таблица 15

Оценка сходимости методики анализа субстанции Ніб по показателю
«Распределение по размеру молекул»

№ измерения	R_r , мин	S , %	Kd
1	13,750	99,100	0,382
2	13,770	99,200	0,375
3	13,750	99,300	0,372
4	13,750	99,200	0,376
5	13,730	99,400	0,374
6	13,730	99,400	0,374
Среднее	13,747	99,267	0,376
RSD, %	0,110	0,122	0,919

Для оценки влияния внутрилабораторных вариаций два исследователя анализировали в трех повторах в различные дни одну серию субстанции Ніб и рассчитывали величину RSD для времени удерживания, процента площади пика основного вещества и его константы распределения. RSD для каждого исполнителя не должно превышать 3 %; между исполнителями – 5 %.

Результаты показали, что величина RSD для каждого из исполнителей находилась в пределах от 0,042 до 1,83 % и не превышала 3 %, между исполнителями – от 0,08 до 1,21 % и не превышала 5 % (таблица 16).

Оценка внутрилабораторной прецизионности методики анализа
субстанции Ніб по показателю «Распределение по размеру молекул»

Исполнитель	День	R_b , мин	S, %	Kd
1	1	13,76	99,20	0,377
	2	13,74	99,33	0,363
	3	13,75	99,37	0,369
	Среднее	13,75	99,30	0,37
	RSD %	0,073	0,113	1,83
2	1	13,77	99,20	0,369
	2	13,78	99,33	0,371
	3	13,78	99,37	0,370
	Среднее	13,78	99,48	0,37
	RSD %	0,042	0,044	0,57
Среднее		13,76	99,30	0,37
RSD %		0,12	0,08	1,21

Таким образом, в ходе анализа полученных результатов и их сравнения с критериями приемлемости можно сделать вывод о том, что метод определения молекулярных параметров субстанции Ніб с использованием аналитической колонки TSK-Gel G5000PWx1 7,8x300 мм, является точным, специфичным и может быть включен в проект нормативной документации на субстанцию Ніб.

Основные валидационные характеристики метода представлены в таблице 17.

Таблица 17

Основные валидационные характеристики методики анализа
субстанции Ніб по показателю «Распределение по размеру молекул»

Аналитическая характеристика		Результаты
1		2
Специфичность		Обеспечивается дифференцирование столбнячного анатоксина, PRP и конъюгата PRP с белком-носителем.
Сходимость	R_t	0,110 %
	S	0,122 %
	Kd	0,919 %

1		2
Внутрилабораторная прецизионность (для каждого исполнителя)	R_t	0,073 % и 0,042 %
	S	0,113 % и 0,044 %
	Kd	1,83 % и 0,57 %
Внутрилабораторная прецизионность (между исполнителями)	R_t	0,12 %
	S	0,08 %
	Kd	1,21 %

Значение коэффициента распределения для исследуемых серий субстанции Ніб находилось в диапазоне 0,32-0,33, что соответствовало требованиям производителя и Европейской Фармакопеи (табл. 18)

Таблица 18

Результаты определения коэффициента распределения основного компонента в исследуемых сериях субстанции Ніб

Серия субстанции Ніб	R_{te}	R_{tt}	R_{to}	V_e	V_t	V_o	Kd
53IFA1101	13,80	20,50	10,50	8,28	12,30	6,30	0,33
53IFA1110	13,77	20,45	10,50	8,26	12,27	6,30	0,33
53IFA1205	13,72	20,47	10,50	8,23	12,28	6,30	0,32
53IFA1210	13,75	20,35	10,50	8,25	12,21	6,30	0,33

Примечание: R_{te} - время удерживания субстанции Ніб; R_{to} - время удерживания высокомолекулярной ДНК; R_{tt} - время удерживания раствора натрия азида 0,05%.

3.3. Характеристика субстанции Ніб по показателям «Содержание полирибозилрибитола фосфата» и «Содержание свободного полирибозилрибитола фосфата»

Количественное содержание полисахарида в активной фармацевтической субстанции устанавливали колориметрическим методом с использованием орцинолового реактива и коммерческой D-рибозы.

Количественное содержание свободного PRP в активной фармацевтической субстанции определяли тем же методом предварительно отделив несвязанный PRP от конъюгированного с помощью центрифужной

ультрафильтрации с использованием ультрафильтрационных концентраторов Amicon Ultra-0,5 с порогом отсечения 30 кДа («Millipore», Германия). В процессе центрифужной ультрафильтрации свободный PRP, обладающий меньшим размером, чем поры мембран ультрафильтрационного концентратора, проходит сквозь них, в то время как молекулы конъюгата, в которых PRP связан с белком-носителем, обладают большим размером и задерживаются в концентраторе.

Центрифужную ультрафильтрацию проводили при 10000 об/мин в течение 20 мин. Содержание свободного PRP определяли в полученном фильтрате.

Количество свободного PRP (F , %) рассчитывали по формуле:

$$F = \frac{b}{a} \times 100\% , \text{ где}$$

b - содержание PRP в фильтрате, мг/мл;

a - общее содержание PRP в субстанции, мг/мл.

Каждый раз при проведении анализа в качестве контроля использовали международный стандарт полисахарида *Haemophilus influenzae* тип b полирибозилрибитола фосфат (PRP), 02/208 («NIBSC», UK), содержание полисахарида в котором установлено в реакции с орциноловым реактивом и составляло $4,933 \pm 0,267$ мг/мл [187].

Валидацию методики проводили по следующим показателям: линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность), диапазон применения. Валидацию проводили на примере субстанции Hib серии 53IFA1110.

При оценке линейности метода анализировали растворы субстанции Hib в концентрациях PRP 2,5, 5, 10, 20 и 40 мкг/мл, строили график зависимости оптической плотности от концентрации PRP в образцах и рассчитывали коэффициент корреляции. Для каждой исследуемой концентрации анализ проводили в трех повторах.

Для определения правильности метода для всех растворов рассчитывали величины степени извлечения. Для установления диапазона применения методики определяли точность каждой точки кривой посредством расчета экспериментального t-критерия Стьюдента и сравнения его с табличным критерием для 95% уровня значимости и степени свободы $n-1$.

Результаты оценки правильности в диапазоне применения методики представлены в таблице 19.

Таблица 19

Оценка правильности методики в пределах диапазона применения методики определения содержания PRP в субстанции Ніб

Теоретическая концентрация PRP, мкг/мл	2,50	5,00	10,00	20,00	40,00
Среднее значение измеренной концентрации, мкг/мл	2,43	5,21	10,10	20,35	42,13
RSD, % (не более 10%)	4,21	3,16	1,28	2,66	2,49
Степень извлечения, % (80-120%)	97,20	104,20	101,00	101,75	105,33
Расчетный коэффициент Стьюдента, t (Табличный коэффициент Стьюдента, (0,05;2) 4,303)	-0,03	0,12	0,14	0,23	1,48

Среднее значение степени извлечения для всех модельных растворов находилось в диапазоне от 97,20 до 105,33 %, что соответствовало критерию приемлемости (80-120 %).

Результаты оценки линейности метода показали, что зависимость строго линейна, расчетная величина коэффициента корреляции составила 0,9985, что свидетельствовало о том, что в данных интервалах концентраций методика обеспечивает определение PRP в субстанции Ніб с требуемой линейностью.

Для определения сходимости метода проводили шесть последовательных анализов одной серии субстанции Ніб, рассчитывали содержание общего PRP в мг/мл, свободного PRP в % и величину RSD, которая не должна превышать 5%.

Оценка сходимости метода показала, что RSD результатов определения концентрации общего PRP и свободного PRP не превышало 2,14 %, что свидетельствовало о точности методики. Результаты определения сходимости метода представлены в таблице 20.

Таблица 20

Результаты определения сходимости характеристики колориметрического метода с орциоловым реактивом

№ измерения	1	2	3	4	5	6	Среднее	RSD, %
Концентрация PRP, мг/мл	0,533	0,534	0,528	0,527	0,530	0,527	0,530	0,580
Концентрация свободного PRP, %	1,150	1,100	1,150	1,130	1,160	1,110	1,130	2,140

При установлении влияния внутрилабораторных вариаций два исследователя анализировали в трех повторах в различные дни исследуемую серию субстанции Ніб и рассчитывали величину RSD полученных результатов.

RSD при оценке внутрилабораторной прецизионности для каждого исполнителя и между исполнителями не должно превышать 10%.

Полученные данные показали, что RSD результатов определения концентрации общего PRP и свободного PRP при оценке внутрилабораторных вариаций для каждого из исполнителей не превышала 3,51 %, между исполнителями - 2,76 %. Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности метода представлены в таблице 21.

Таблица 21

Результаты определения внутрилабораторной прецизионности колориметрического метода с орциоловым реактивом

Исполнитель	День	Концентрация PRP, мкг/мл	Концентрация свободного PRP, %
1	2	3	4
1	1	0,533	1,150
	2	0,534	1,100
	3	0,528	1,130

1	2	3	4
	Среднее	0,530	1,130
	RSD %	0,600	2,550
2	1	0,525	1,100
	2	0,536	1,140
	3	0,520	1,180
	Среднее	0,527	1,140
	RSD %	1,550	3,510
Среднее		0,529	1,140
RSD %		1,160	2,760

Основные валидационные характеристики метода представлены в таблице 22.

Таблица 22

Основные валидационные характеристики колориметрического метода с орциноловым реактивом

Аналитическая характеристика		Результаты
Правильность		97,20 - 105,33 %
Линейность (коэффициент корреляции)		$r = 0,9985$
Диапазон применения		От 2,50 до 40,00 мкг/мл
Сходимость	Общий PRP	0,58%
	Свободный PRP	2,14%
Внутрилабораторная прецизионность (для каждого исполнителя)	Общий PRP	0,60 и 1,55 %
	Свободный PRP	2,55 и 3,51 %
Внутрилабораторная прецизионность (между исполнителями)	Общий PRP	1,16%
	Свободный PRP	2,76%
Специфичность		0,43

На основании проведенных исследований было сделано заключение о возможности применения колориметрического метода с использованием орцинолового реактива для контроля субстанции Ніб по показателю «Содержание PRP» и «Содержание свободного PRP».

Общее содержание PRP в исследуемых сериях субстанции Ніб находилось в диапазоне от 0,53 до 1,36 мг/мл, при этом содержание

свободного PRP не превышало 1,13%. Результаты представлены в таблице 23.

Таблица 23

Результаты количественного определения общего содержания PRP и свободного PRP в исследуемых сериях субстанции Ніб

Серия субстанции Ніб	Измеренное содержание PRP	
	Общий PRP, мг/мл	Свободный PRP, %
53IFA1110	0,530±0,05	1,13±0,3
53IFA1205	1,358±0,20	1,03±0,1
53IFA1210	0,737±0,08	0,41±0,3
53IFA1407	1,110±0,06	0,72±0,2

3.4. Характеристика субстанции Ніб по показателям «Белок» и «Соотношение полисахарид : столбнячный анатоксин»

Определение содержания белка-носителя столбнячного анатоксина в исследуемых сериях субстанции Ніб проводили методом Лоури без предварительного осаждения белка (Метод А).

Для проведения анализа готовили разведения исследуемых серий субстанции водой очищенной в соотношении 1:20, 1:50 и 1:100.

Поскольку метод является фармакопейным, его валидацию не проводили.

При определении соотношения PRP : белок-носитель столбнячный анатоксин пользовались расчетным методом на основании результатов, полученных при определении содержания белка и полисахарида.

Содержание белка в исследуемых сериях субстанции Ніб находилось в диапазоне от 1,41 до 3,63 мг/мл. Отношение PRP к столбнячному анатоксину находилось в диапазоне от 0,34 до 0,38. Результаты представлены в таблице 24.

Результаты количественного определения белка и соотношение PRP/TT
в исследуемых сериях субстанции Ніб

Серия субстанции Ніб	Содержание белка, мг/мл	Соотношение PRP/TT
53IFA1110	1,41±0,22	0,38
53IFA1205	3,63±0,06	0,37
53IFA1210	2,06±0,04	0,36
53IFA1407	3,26±0,12	0,34

3.5. Характеристика субстанции Ніб по показателю «Остаточные функциональные группы»

Свободными функциональными группами белка-носителя субстанции Ніб - столбнячного анатоксина являются сульфгидрильные группы (SH). Они представляют собой функциональные группы белка, которые не провзаимодействовали с активированным PRP, равно как с использованным этилмалеимидом.

Валидацию методики проводили по следующим показателям: линейность, правильность, диапазон применения, предел количественного определения, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность), специфичность.

Для оценки линейности метода анализировали растворы глутатиона в следующих концентрациях: 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 мМ, строили график зависимости оптической плотности от концентрации глутатиона в растворе и рассчитывали коэффициент корреляции. Для каждой исследуемой концентрации анализ проводили в двух повторах.

Для определения правильности метода для всех растворов рассчитывали величины степени извлечения. При установлении диапазона применения методики определяли точность каждой точки кривой посредством расчета экспериментального t-критерия Стьюдента и сравнения

его с табличным критерием для 95% уровня значимости и степени свободы $n-1$.

Результаты оценки правильности в диапазоне применения методики представлены в таблице 19.

Таблица 25

Результаты определения правильности в пределах диапазона
применения методики

Теоретическая концентрация глутатиона, мМ	0,25	0,50	1,00	2,00	3,00	4,00
Среднее значение измеренной концентрации, мМ	0,26	0,49	0,99	2,01	3,00	4,00
RSD, % (не более 10%)	7,83	4,53	4,93	1,11	1,79	1,02
Степень извлечения, % (80-120%)	104,00	98,00	99,00	100,50	100,00	100,00
Расчетный коэффициент Стьюдента, t (Табличный коэффициент Стьюдента, (0,05;2) 4,303)	1,05	-0,68	-0,55	0,98	0,14	-0,24

Среднее значение степени извлечения для всех растворов находилось в диапазоне от 98 до 104 %, что соответствовало критерию приемлемости (80-120%).

Результаты оценки линейности показали, что зависимость строго линейна, расчетная величина коэффициента корреляции составила 0,9993, что свидетельствовало о том, что в диапазоне концентраций от 0,25 до 4,00 мМ методика обеспечивает определение сульфгидрильных групп в субстанции Ніб с требуемой линейностью. Предел количественного определения составил 0,25 мМ.

Для определения сходимости метода проводили шесть последовательных анализов раствора глутатиона в концентрации 1 мМ и для полученных результатов рассчитывали величину RSD, которая не должна превышать 5%.

Анализ данных по изучению сходимости показал, что RSD результатов определения концентрации сульфгидрильных групп не превышало 3,41 %,

что свидетельствовало о точности методики. Полученные результаты представлены в таблице 26.

Таблица 26

Результаты определения сходимости метода Элмана

№ измерения	1	2	3	4	5	6	Среднее	RSD, %
Концентрация глутатиона, мМ	1,05	1,00	0,95	1,02	1,00	0,98	1,00	3,41

Для оценки влияния внутрилабораторных вариаций два исследователя анализировали в трех повторах в различные дни раствор глутатиона в концентрации 1 мМ и рассчитывали величину RSD. RSD при определении внутрилабораторной прецизионности для каждого исполнителя и между исполнителями не должно превышать 10%.

Полученные данные показали, что RSD результатов определения концентрации сульфгидрильных групп при оценке внутрилабораторных вариаций для каждого из исполнителей не превышала 2,99 %, между исполнителями – 4,59 %. Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности представлены в таблице 27.

Таблица 27

Результаты определения внутрилабораторной прецизионности метода Элмана

Исполнитель	День	Концентрация PRP, мкг/мл
1	1	1,03
	2	0,99
	3	1,05
	Среднее	1,02
	RSD %	2,99
2	1	1,10
	2	1,09
	3	1,12
	Среднее	1,10
	RSD %	1,38
Среднее		1,06
RSD %		4,59

Основные валидационные характеристики метода представлены в таблице 28.

Таблица 28

Основные валидационные характеристики метода Элмана

Характеристика	Результаты
Правильность	98 - 104 %
Линейность	0,9993
Диапазон применения	0,25 – 4 мМ
Предел количественного определения	0,250 мМ
Сходимость	3,41 %
Внутрилабораторная прецизионность (для каждого исполнителя)	2,99 и 1,38 %
Внутрилабораторная прецизионность (между исполнителями)	4,59 %

На основании проведенных исследований было сделано заключение о возможности применения метода Элмана для контроля субстанции Ніб по показателю «Остаточные функциональные группы».

Остаточных функциональных групп в исследуемых сериях субстанции Ніб не обнаружено. Результаты представлены в таблице 29.

Таблица 29

Результаты количественного определения белка и соотношение PRP/ГТ в исследуемых сериях субстанции Ніб

Серия субстанции Ніб	Остаточные функциональные группы, Мкмоль SH/мкмоль столбнячного анатоксина
53IFA1110	Не обнаружено
53IFA1205	Не обнаружено
53IFA1210	Не обнаружено
53IFA1407	Не обнаружено

3.6. Характеристика субстанции Ніб по показателю «Подлинность»

Согласно рекомендациям ВОЗ и ЕФ одним из основных параметров оценки качества конъюгированных субстанций Ніб-вакцин является оценка

их подлинности. Согласно рекомендациям ЕФ контроль подлинности следует проводить подходящим иммунохимическим методом. Альтернативой может служить метод ЯМР, который хорошо себя зарекомендовал при оценке подлинности полисахаридных вакцин [133], однако он весьма дорогостоящий и трудоемкий, поэтому нами были предложены 2 других метода. Для оценки подлинности полисахаридной составляющей был предложен колориметрический метод с орцином, а для оценки подлинности белка-носителя – метод, основанный на РКОА.

Реакцию с орциноловым реактивом считали положительной при образовании зеленого окрашивания в результате взаимодействия гидролизованной формы рибозы PRP с орцином в присутствии соли железа (III).

Оценку подлинности столбнячного анатоксина проводили в РКОА с использованием тест-набора «ТН-ДСК-КОА» [6, 29].

Пригодность метода для определения столбнячного анатоксина с помощью тест-набора «ТН-ДСК-КОА» была установлена ранее в ходе валидационных исследований по оценке чувствительности, прецизионности (сходимости и воспроизводимости) и специфичности тест-набора [30].

Данные, полученные при оценке подлинности исследуемых серий субстанции Нib, представлены в таблице (табл.30).

Таблица 30

Оценка исследуемых серий субстанции Нib по показателю
«Подлинность»

Образец	№ измерения	Столбнячный анатоксин	Полисахарид
		ДС	Орцинол
1	2	3	4
Положительный контроль АС	1	++++	
	2	++++	
	3	++++	
Отрицательный контроль (ФБР)	1	-	
	2	-	
	3	-	

1	2	3	4
53IFA1110	1	++++	+
	2	++++	+
	3	++++	+
53IFA1205	1	++++	+
	2	++++	+
	3	++++	+
53IFA1210	1	++++	+
	2	++++	+
	3	++++	+
53IFA1407	1	++++	+
	2	++++	+
	3	++++	+

Примечание: АС – анатоксин столбнячный; ФБР – фосфатный буферный раствор; ДС – диагностикум столбнячный.

Таким образом, нами была показана возможность применения набора реагентов «ТН-ДСК-КОА» для контроля подлинности белка-носителя конъюгированной субстанции Нib.

3.7. Характеристика субстанции Нib с помощью фармакопейных методов

При помощи фармакопейных методов анализа был изучен внешний вид исследуемых серий субстанции, рН, наличие механических включений, стерильность, пирогенность и содержание бактериальных эндотоксинов.

По внешнему виду исследуемые серии субстанции представляли собой прозрачную светло-желтую жидкость, не содержащую взвешенных частиц. В исследуемых сериях субстанции значение рН лежало в интервале от 6,87 до 7,14, видимые механические включения отсутствовали. Исследуемые серии субстанции были стерильны, апиrogenны, содержание бактериальных эндотоксинов не превышало 10 ЕЭ/мкг PRP.

При изучении специфической безопасности исследуемый препарат вводили морским свинкам подкожно в объеме, соответствующем пятикрасной разовой дозе, рекомендуемой для человека (50 мкг PRP, 2,5 мл). При этом предварительно серии субстанции Нib разводили до требуемой концентрации стерильным раствором натрия хлорида 0,9 %. В течение всего

срока наблюдения (21 сутки) у подопытных животных не проявлялось признаков интоксикации и снижения массы тела. Ни одно животное не погибло. Исследуемые серии субстанции Ніб были безопасны. Полученные результаты представлены в таблице 31.

На основании проделанной работы нами предложен проект спецификации субстанции Ніб, составленный в соответствие с рекомендациями ВОЗ и ЕФ в отношении контроля активных фармацевтических субстанций, использующихся для производства конъюгированных Ніб-вакцин (табл. 32).

Таблица 31

Результаты контроля субстанции Н1b в соответствии со спецификацией

Серия, №	Описание	Подлинность PRP	Подлинность белка-носителя	pH	Распределение по размеру молекул	Остаточные функциональные группы	Посторонние примеси	Специфическая безопасность	Пирогенность	Стерильность	Содержание PRP	Содержание столбнячного анатоксина (белок)	Соотношение PRP/столбнячный анатоксин	Содержание свободного PRP, %
Нормируемые требования														
	Прозрачная светло-желтая жидкость, не содержащая взвешенных частиц	Должно наблюдаться окрашивание раствора препарата в зеленый цвет	Должны образовываться агглютинаты со столбнячным диагностикумом	От 6,4 до 7,4	Основной пик не менее 90%; Kd≤0,46	Не более 5 мкмоль SH/мкмоль столбнячного анатоксина	НЭМ≤1 мкг/мл; ЭДТА≤ 3,4 мкг/мл; ДМСО≤1,4 мкг/мл	Должен быть безопасным	Должен быть апирогенным	Должен быть стерильным	Не менее 0,5 мг/мл	Не менее 1,04 мг/мл	От 0,32 до 0,48	Не более 20%
1110	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,14±0,02	98,16; 0,33	Отс.	Отс.	Безопасен	Апироген	Стерилен	0,530±0,05	1,41±0,22	0,39	1,13±0,3
1205	Соотв.	Соотв.	Соотв.	6,87±0,02	97,87; 0,33	Отс.	Отс.	Безопасен	Апироген	Стерилен	1,358±0,2	3,63±0,06	0,35	1,03±0,1
1210	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,1±0,02	97,13; 0,32	Отс.	Отс.	Безопасен	Апироген	Стерилен	0,737±0,08	2,06±0,04	0,37	0,41±0,3
1407	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,06±0,02	99,54; 0,33	Отс.	Отс.	Безопасен	Апироген	Стерилен	1,045±0,06	3,26±0,12	0,32	0,72±0,2

Примечание: Соотв. – соответствует установленным требованиям, Отс. - отсутствуют.

Спецификация субстанции Ніб

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
Описание	Визуальный	Прозрачная светло-желтая жидкость, не содержащая взвешенных частиц
Подлинность: Белок-носитель	РКОА	Должны образовываться агглютинаты со столбнячным диагностикумом
Подлинность PRP	Колориметрический с орцином	Должно быть окрашивание раствора субстанции в зеленый цвет в результате реакции с орцином
pH	Потенциометрический, ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0004.15	От 6,4 до 7,4
Распределение по размеру молекул	ВЭЖХ (гель-фильтрация) ГФ XIII, ОФС.1.2.1.2.0005.15	Основной пик не менее 90 % Kd ≤ 0,46
Остаточные функциональные группы	Метод Элмана/Лоури	Не более 5 мкмоль SH/мкмоль столбнячного анатоксина
Посторонние примеси: - НЭМ - ЭДТА - ДМСО	ВЭЖХ-ОФ	Не более 1 мкг/мл Не более 3,4 мкг/мл Не более 1,4 мкг/мл
Специфическая безопасность	Биологический	Должна быть безопасной
Пирогенность	Биологический ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0005.15	Должна быть апиrogenной
Стерильность	Метод прямого посева, ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0003.15	Должна быть стерильной
Соотношение PRP:столбнячный анатоксин	Расчетный Колориметрический с орцином/Лоури	От 0,32 до 0,48
Содержание PRP	Колориметрический с орцином	Не менее 0,5 мг/мл
Содержание столбнячного анатоксина (белок)	Метод Лоури, ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0023.15	Не менее 1,04 мг/мл
Содержание свободного PRP	Метод центрифужной ультрафильтрации Колориметрический с орцином	Не более 20 % от номинальной величины

В ходе исследований нами было показано, что серии субстанции Ніб производства HeberBiotech (Республика Куба) полностью удовлетворяют требованиям, предъявляемым ЕФ и отечественными регулирующими

документами к субстанциям конъюгированных Hib-вакцин, и могут быть использованы для производства вакцинных препаратов.

ГЛАВА 4. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ФОРМЫ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ НАЕМОРИЛUS INFLUENZAE ТИП В

Одним из наиболее распространенных методов стабилизации дорогостоящих, лабильных иммунобиологических препаратов, таких как вакцины, является лиофильное высушивание [62, 94, 95]. Лиофилизацию используют в производстве около 1/3 применяемых в настоящее время вакцин [25, 33, 135, 144, 178, 189].

Параметры режима лиофилизации должны быть тщательно отработаны таким образом, чтобы гарантировать получение вакцинного препарата, соответствующего всем предъявляемым к нему требованиям, включая такие характеристики как специфическая активность, пирогенность, рН, осмоляльность, остаточная влажность, растворимость и внешний вид сухой массы, которые являются основными показателями качества вакцины и должны сохраняться на протяжении всего установленного срока хранения препарата [73, 132, 178].

Настоящая глава посвящена разработке лиофилизированной формы Н1b-вакцины на основе синтетической субстанции и включает описание исследований, направленных на подбор оптимального состава Н1b-вакцины и режима ее лиофильного высушивания. Кроме того, представлены характеристика готового препарата, данные по изучению его стабильности и установлению срока годности.

4.1. Разработка варианта защитной среды для лиофилизации Н1b-вакцины

Для защиты активного компонента вакцины в ходе замораживания (криопротекция) и высушивания (лиопротекция) в состав препарата вводятся стабилизаторы [184]. В связи с этим первой задачей при конструировании протектора для лиофилизации являлся выбор стабилизатора, оказывающего

защитное действие на основной антиген вакцины на этапах замораживания и высушивания, и его концентрации, достаточной для получения сухого препарата с требуемыми характеристиками.

Выбор стабилизаторов, которые могут быть включены в состав препаратов для парентерального введения, весьма ограничен и при включении большинства из них в композиции для лиофилизации возникают проблемы [102, 107].

Распространенными стабилизаторами, выступающими одновременно в роли крио- и лиопротекторов являются сахара, такие как сахароза, мальтоза, лактоза и трегалоза. Из анализа данных литературы известно, что использование восстанавливающих сахаров (мальтоза и лактоза) может приводить к повреждениям в структуре некоторых высушенных белков [84], поэтому применение невосстанавливающих дисахаридов является более предпочтительным [171].

Было проведено сравнительное исследование протективных свойств углеводов, используемых в составе разрешенных к применению в РФ вакцин для профилактики гемофильной инфекции тип *b*: сахарозы и лактозы.

Известно, что получаемый внешний вид высушенного препарата во многом зависит от эвтектических параметров подготовленного к розливу и сублимации раствора. Чем ниже его эвтектическая температура, тем он более требователен к температуре замораживания [25, 38]. Поэтому первоначально были установлены температуры полного затвердевания исследуемых растворов стабилизатора (табл. 33), а также растворов субстанции Н1в-вакцины и натрий-фосфатного буфера (табл. 34). При этом для определения эвтектической температуры субстанцию Н1в-вакцины разводили водой для инъекций до концентрации PRP, соответствующей одной вакцинной дозе (20 мкг/мл).

Оценка эвтектических параметров исследуемых стабилизаторов в различных концентрациях

№	Наименование	Концентрация, %	Эвтектическая температура, °С
1	Сахароза	2,5	минус 10,10
		4,5	минус 10,20
		6,5	минус 11,60
		8,5	минус 11,85
2	Лактоза	2,5	минус 8,00
		4,5	минус 8,50
		6,5	минус 10,30
		8,5	минус 10,50

Таблица 34

Эвтектические параметры компонентов вакцины

№	Наименование	Эвтектическая температура, °С
1	Раствор субстанции Нib (20 мкг/мл PRP)	минус 6,5
2	Натрий-фосфатный буфер 0,01М	минус 2,2

Экспериментальные исследования свойств защитных сред проводили с использованием производственного оборудования. Активную фармацевтическую субстанцию Нib смешивали с концентрированным натрий-фосфатным буферным раствором (0,1М) и раствором стабилизатора до достижения концентраций основного антигена (PRP) 20 мкг/мл (или 10 мкг в 0,5 мл - доза, рекомендуемая для человека), натрий-фосфатного буферного раствора - 0,01М, стабилизатора - 2,5; 4,5; 6,5 и 8,5%.

Полученный раствор Нib-вакцины разливали по 0,5 мл в ампулы и помещали в сублимационную установку. С учетом эвтектических параметров структурных компонентов вакцины замораживание проводили при температуре не выше минус 35 °С. Общая продолжительность цикла высушивания при интенсивном нагреве продукта до температуры (34±4) °С не превышала 60 ч. По окончании сушки ампулы герметизировали в атмосфере стерильного воздуха. В препарате определяли показатели рН,

осмоляльности, остаточной влажности и визуально оценивали качество сухой массы по наличию дефектов ее структуры (табл. 35). Отбраковывали образцы, не соответствующие требованиям, в том числе ампулы, с признаками карамелизованного или вспененного препарата.

Таблица 35

Требования, предъявляемые к лиофильно высушенному препарату

Наименование показателя	Требование
Описание	Аморфная масса белого цвета
Растворимость	Должна полностью растворяться в 0,5 мл воды для инъекций в течение 1-2 мин
Потеря в массе при высушивании	Не более 3,0 %
рН	От 6,4 до 7,4
Осмоляльность	Не менее 200 мОсмоль/кг

Для определения показателей рН и осмоляльности исследуемые лиофилизированные образцы растворяли в 0,5 мл воды для инъекций.

Состав и характеристика растворов экспериментальных образцов Ніб-вакцины с исследуемыми стабилизаторами, влияние вспомогательных веществ на эвтектические свойства Ніб-вакцины и достигаемый структурообразующий эффект представлены в таблицах 36 - 39

Таблица 36

Характеристика растворов экспериментальных образцов Ніб-вакцины с различной концентрацией сахарозы до лиофильного высушивания

Концентрация активного компонента субстанции Ніб, мкг/мл	Молярность буферной системы, М	Концентрация сахарозы, %	Эвтектическая температура, °С	рН	Осмоляльность, мОсмоль/кг
20	0,01	2,5	минус 21,5	7,38±0,04	81,7±1,1
		4,5	минус 22,8	7,36±0,04	144,0±2,5
		6,5	минус 23,0	7,34±0,02	208,0±4,5
		8,5	минус 23,0	7,32±0,01	272,0±4,0

Характеристика растворов экспериментальных образцов Нib
вакцины с различной концентрацией лактозы до лиофильного
высушивания

Концентрация активного компонента субстанции Нib, мкг/мл	Молярность буферной системы, М	Концентрация лактозы, %	Эвтектическая температура, °С	рН	Осмоляльность, мОсмоль/кг
20	0,01	2,5	минус 17,6	7,38±0,02	80,0±2,1
		4,5	минус 18,1	7,36±0,02	138,0±3,8
		6,5	минус 19,6	7,34±0,04	196,0±2,2
		8,5	минус 20,9	7,30±0,03	276,0±3,6

Таблица 38

Характеристика экспериментальных образцов Нib-вакцины с
различной концентрацией сахарозы после лиофильного высушивания

Концентрация активного компонента субстанции Нib, мкг/мл	Молярность буферной системы, М	Концентрация сахарозы, %	рН	Осмоляль ность, мОсмоль/ кг	Остаточная влажность, %	% некондиционных образцов
20	0,01	2,5	7,4 ±0,1	79±1,1	-*	до 100
		4,5	7,36 ±0,04	142±1,0	4,5±0,1	10,3±3,5
		6,5	7,32 ±0,06	202±0,5	2,7±0,2	7,5±1,3
		8,5	7,3 ±0,02	259±1,4	1,1±0,2	1,5±0,7

Примечание -* испытание на остаточную влажность не проводили, поскольку образцы были забракованы по показателю «Описание».

Характеристика экспериментальных образцов Ніб-вакцины с различной концентрацией лактозы после лиофильного высушивания

Концентрация активного компонента субстанции Ніб, мкг/мл	Молярность буферной системы, М	Концентрация лактозы, %	рН	Осмоляльность, мОсмоль/кг	Остаточная влажность, %	% некондиционных образцов
20	0,01	2,5	7,37 ±0,02	82±2,0	4,3±0,2	4,2±1,3
		4,5	7,33 ±0,01	139±1,7	3,7±0,1	5,2±0,9
		6,5	7,32 ±0,04	175±2,0	2,7±0,2	4,8±1,5
		8,5	7,30 ±0,04	249±1,4	2,5±0,1	3,1±1,0

Результаты апробации показали, что по внешнему виду сухой массы и по показателю остаточной влажности наиболее выраженный положительный результат обнаружен у защитных сред, в составе которых использовали сахарозу и лактозу в концентрациях 6,5 и 8,5 %. Составы с меньшей концентрацией стабилизатора уступали по данным показателям.

На основе комплексной оценки защитного действия, а также анализа сопутствующих аспектов технологического и экономического характера для изготовления Ніб-вакцины и внедрения в производство этого препарата была выбрана защитная среда с содержанием сахарозы как наиболее подходящего крио и лиопротектора в концентрации 8,5 %.

Эффективность защитных сред была также проанализирована по показателям рН и осмоляльности. Перед анализом лиофилизированную Ніб-вакцину растворяли в 0,5 мл воды для инъекций. Установлено, что в процессе лиофилизации не происходило скачкообразных изменений рН и осмоляльности раствора Ніб-вакцины, значения показателей находились в пределах установленных норм.

С учетом полученных результатов был установлен состав одной дозы (0,5 мл) Ніб-вакцины, который приведен в таблице 40.

Состав одной дозы готовой лекарственной формы Нiв-вакцины

Компонент вакцины	Количество в одной дозе (0,5 мл)
<i>Активный компонент:</i>	
Полирибозилрибитола фосфат, конъюгированный со столбнячным анатоксином (АО «ЭберБиотек», Куба)	10±2 мкг
Столбнячный анатоксин конъюгированный (АО «Эбер Биотек», Республика Куба, номер реестровой записи – № ФС-000757)	от 20 до 31 мкг
<i>Вспомогательные вещества:</i>	
Сахароза	42,5 мг
Натрия дигидрофосфат	0,16 мг
Динатрия гидрофосфат	0,5 мг

Таким образом, в ходе исследований было показано, что разработанный состав Нiв-вакцины гарантирует сохранение требуемых физико-химических свойств препарата в процессе лиофилизации.

4.2. Отработка режима лиофильного высушивания Нiв-вакцины

Наряду с выбором вспомогательных веществ для конструирования вакцинных препаратов неотъемлемым является выбор первичной упаковки. Обычно материалом первичной упаковки служит боросиликатное стекло первого гидролитического класса, поскольку обладает высокой химической устойчивостью и низким уровнем выщелачиваемости ионов.

Еще одним критерием при выборе первичной упаковки является объем раствора для лиофилизации, который должен составлять 20-50% от объема первичной упаковки [184].

С учетом указанных требований розлив стерильного раствора Нib-вакцины осуществляли по 0,5 мл в ампулы ШП-2 (емкостью 2 см³), что составляло 25% объема при высоте столба (9±1) мм.

В ходе отработки процесса замораживания Нib-вакцины первоначально была определена эвтектическая точка для выбранного состава вакцины, которая составляла минус 23 °С. Поэтому верхний предел температуры замораживания, обеспечивающий не только полное затвердевание раствора, но и формирование в процессе собственно сублимации сухой пористой массы, был установлен на уровне не выше минус 35 °С. Замораживание стерильного раствора Нib-вакцины в ампулах проводили в сублимационной установке ТГ-50.

Был апробирован вариант сверхмедленного замораживания, обеспечивающий формирование однородной кристаллической структуры в целом во всей серии препарата. Начальную температуру полок сублиматора устанавливали на уровне не ниже минус 15 °С, а затем после загрузки ампул с разлитым препаратом температуру понижали со скоростью порядка (7,5±2,5) °С/ч. Конечная достигаемая температура составляла минус (40±5) °С. Такой подход позволяет сформировать в процессе охлаждения большое количество центров кристаллизации, что при последующем процессе сублимационного высушивания Нib-вакцины дает возможность получить необходимую структуру и объем препарата соответствующего внешнего вида. Продолжительность замораживания составляла 8 ч (рис. 17).

При отработке режима сублимационного высушивания было установлено, что из ряда апробированных вариантов оптимальным можно считать режим интенсивного нагрева полок со скоростью (15 ± 5) °С/ч до конечной температуры (34 ± 4) °С. При этом должны быть обеспечены стандартные показатели вакуума и температуры конденсатора (не более 16,0 Па, не выше минус 50 °С соответственно).

Продолжительность этапа досушивания обусловлена требованиями к содержанию остаточной влаги в препарате. Этот уровень, составляющий не

более 3 %, достигается при выдерживании препарата в плюсовом диапазоне температур в течение 15 ч (рис. 18).

Таким образом, общая продолжительность процесса сублимационного высушивания Нib-вакцины не должна превышать 32 часа.

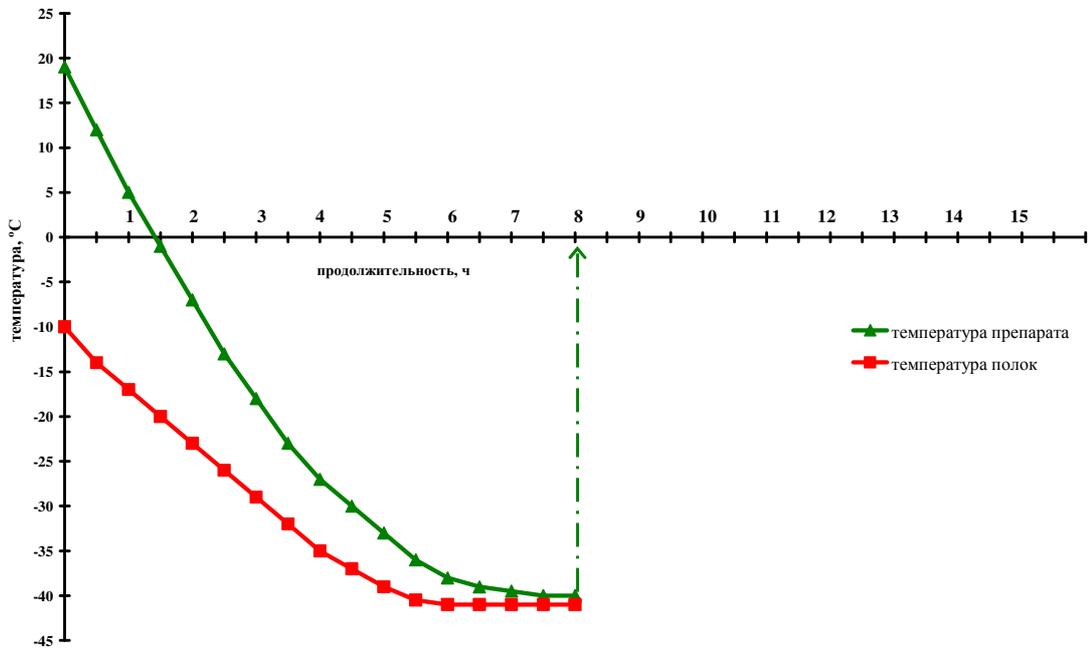


Рис. 17. Оптимизированный режим замораживания Нib-вакцины.

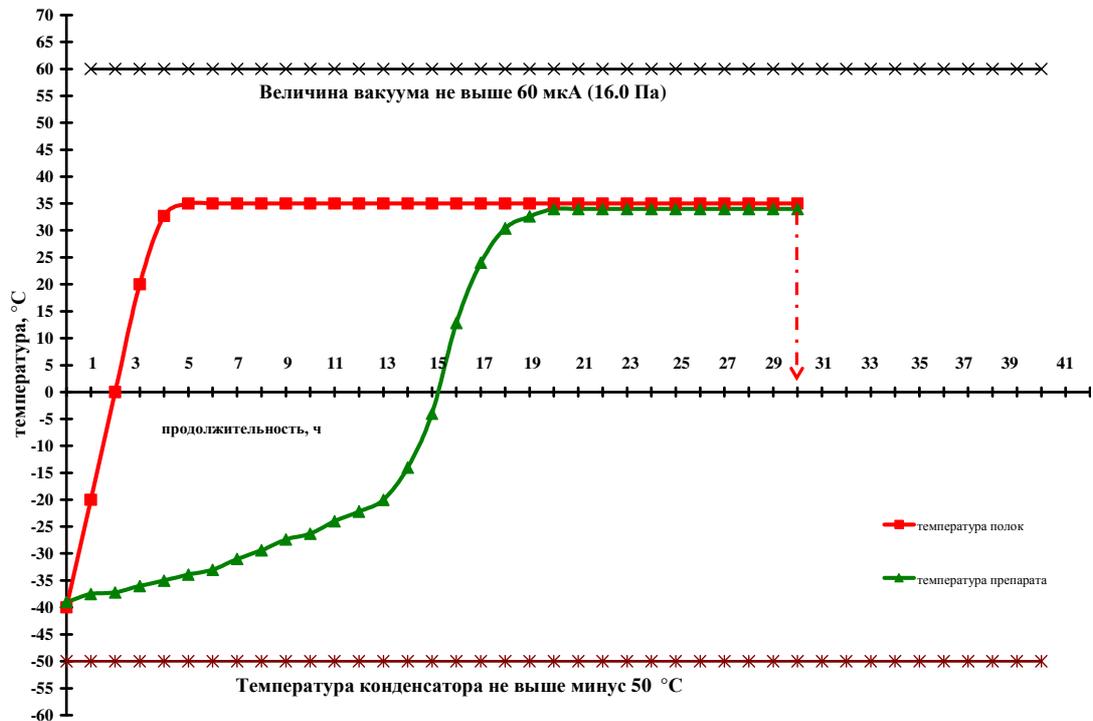


Рис. 18. Оптимизированный режим сублимации Нib-вакцины.

По разработанному режиму лиофилизации было получено 6 серий Ніб-вакцины (объем серии 1500 ампул). Параметры технологического процесса лиофильного высушивания находились в пределах установленных границ и воспроизводились от серии к серии (табл. 41).

Таблица 41

Параметры процесса лиофильного высушивания Ніб-вакцины

Объект контроля	Наименование контролируемого показателя	Установленные нормы	Среднее значение параметра, n=6
Замораживание полуфабриката Ніб вакцины	Начальная температура полок сублиматора	не ниже минус 15 ⁰ С	минус 13±2 °С
	Конечная температура полок сублиматора	не выше минус 35 ⁰ С	минус 38,5±2,5°С
	Конечная температура продукта	не выше минус 35 ⁰ С	минус 37,5±2,5°С
	Продолжительность	не менее 8 ч	8,5±0,5 ч
Сублимационное высушивание полуфабриката Ніб вакцины	Величина вакуума	60 мкА (16,0 Па)	не более 60 мкА
	Температура пластин конденсатора	не выше минус 50 ⁰ С	не выше минус 50°С
	Конечная температура полок	(33±4) ⁰ С	35±3°С
	Конечная температура продукта	(33±4) ⁰ С	34,2±2,5°С
	Время выдержки продукта при плюсовой температуре	Не менее 15 ч	17±2 ч
	Продолжительность сублимационного высушивания	(28±4) ч	29±2,5 ч

Предложенный режим лиофилизации Ніб-вакцины в настоящее время используется в Пермском филиале АО «НПО «Микроген» и включен в производственные регламенты на пентавакцины АКДС-ГепВ+Ніб и аАКДС-ГепВ+Ніб.

4.3. Разработка методики анализа готовой лекарственной формы Нib-вакцины по показателю «Специфическая активность» и ее валидация

Определение количественного содержания конъюгированного и не связанного (свободного) PRP проводили с помощью колориметрического метода с орциноловым реактивом.

Определение общего PRP данным методом в жидких лекарственных формах конъюгированных Нib-вакцин не вызывало затруднений (поскольку не содержат в своем составе стабилизаторов из группы пентоз, гексоз или гептоз), в то время как в лиофилизированных лекарственных формах конъюгированных Нib-вакцин, содержащих сахарозу, имел место эффект интерференции.

В связи с этим представлялось целесообразным разработать процесс пробоподготовки, позволяющий полностью удалить сахарозу из раствора Нib-вакцины.

Нами было установлено, что наиболее приемлемым способом является процесс мембранной фильтрации с использованием центрифужных ультрафильтрационных ячеек (Amicon Ultra-15 с порогом отсечения 30 кДа, «Millipore», Германия), идеально подходящих для удаления сахаров. При этом удаление сахарозы через мембрану ультрафильтрационной ячейки сопровождается концентрированием образца.

Фильтрацию испытуемых образцов Нib-вакцины с помощью центрифужных ультрафильтрационных ячеек повторяли до полного удаления сахарозы из образца под контролем ВЭЖХ.

На рисунке 19 представлены хроматографические профили раствора сахарозы, раствора Нib-вакцины до проведения диализа и раствора Нib-вакцины после удаления сахарозы.

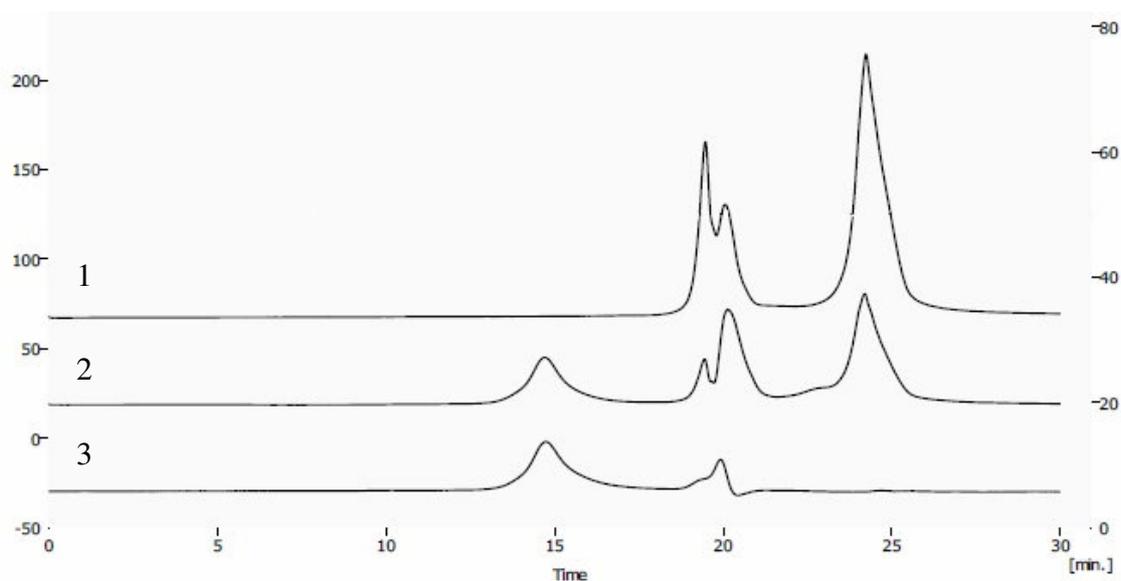


Рис. 19. Хроматографические профили раствора сахарозы (1), Нib-вакцины (2) и Нib-вакцины после полного удаления сахарозы (3).

Полученные результаты явились основанием для разработки алгоритма пробоподготовки. Для анализа отбирали 5 ампул Нib-вакцины (50 мкг PRP). Содержимое каждой ампулы растворяли в небольшом количестве воды очищенной и количественно переносили в ультрафильтрационную ячейку. После промывки водой очищенной в соотношении 1:20 остаточный объем жидкости доводили водой очищенной до 5 мл (до достижения концентрации PRP 10 мкг/мл).

Введенная стадия пробоподготовки испытуемых растворов Нib-вакцин, позволяя полностью удалять сахарозу, обеспечивает получение достоверных результатов при определении PRP в лиофилизированной форме конъюгированных Нib-вакцин.

Содержание свободного PRP в лиофилизированной Нib-вакцине определяли расчетным методом, исходя из номинального содержания PRP в одной дозе препарата, по следующей формуле:

$$C_{\text{своб}} = \frac{C_N - C_{\text{PRP}}}{C_N} * 100\%, \text{ где}$$

C_N – номинальное содержание PRP в ампуле, равное 10 мкг

C_{PRP} – содержание PRP в одной дозе (ампуле) препарата, определенное с помощью колориметрического метода с орцином.

В таблице 42 представлены результаты определения свободного и конъюгированного PRP в исследуемых вакцинных препаратах, полученные с помощью колориметрического метода с орциноловым реактивом, применяя разработанный способ пробоподготовки.

Таблица 42

Содержание PRP в конъюгированных Hib-вакцинах

Вакцина	Свободный PRP, % (не более 20%) ¹	Конъюгированный PRP (не менее 80% от номинальной величины) ¹		Номинальное содержание PRP, мкг/доза
		мкг/доза	%	
Hib-вакцина с.1	5,80±3,56	9,42±0,37	94,20±3,74	10
Hib-вакцина с.2	11,70±2,41	8,83±0,31	88,30±3,12	10
Hib-вакцина с.3	0,80±0,30	9,92±0,25	99,20±2,46	10
Hib-вакцина с.4	2,25±1,16	9,78±0,28	97,80±2,76	10
Hib-вакцина с.5	8,81±3,11	9,11±0,13	91,10±1,30	10
Hib-вакцина с.6	3,13±1,74	9,69±0,25	96,90±2,54	10
Акт-ХИБ®	10,88±4,30	8,91±0,49	89,18±4,90	10
Кими-Хиб® ²	4,63±3,01	10,20±0,64	102,10±6,40	10

Примечание: 1 – требования Европейской фармакопеи; 2 – вакцина Кими-Хиб® выпускается в жидком виде и не содержит углеводного стабилизатора, поэтому анализировали без проведения стадии пробоподготовки.

Как видно из представленных результатов, содержание конъюгированного и свободного PRP находилось в пределах норм, установленных Европейской Фармакопеей для конъюгированных Hib-вакцин.

Для подтверждения пригодности метода определения подлинности и количественного содержания PRP в лиофилизированной форме Hib-вакцины,

включающего стадию пробоподготовки, были выполнены валидационные исследования.

Валидацию методики проводили по следующим показателям: линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность), диапазон применения.

Для оценки линейности метода анализировали растворы Нiв-вакцины различных концентраций PRP, охватывающих весь диапазон применения методики, строили график зависимости оптической плотности от концентрации PRP в образцах и рассчитывали коэффициент корреляции. Для каждой исследуемой концентрации анализ проводили в трех повторах.

При определении правильности метода для всех растворов рассчитывали величины степени извлечения. Для установления диапазона применения методики определяли точность каждой точки кривой посредством расчета экспериментального t-критерия Стьюдента и сравнения его с табличным критерием для 95% уровня значимости и степени свободы $n-1$.

Результаты оценки правильности в диапазоне применения методики представлены в таблице 43.

Таблица 43

Результаты определения правильности в пределах диапазона применения методики.

Теоретическая концентрация PRP, мкг/мл	2,5	5	10	20	40
Среднее значение измеренной концентрации, мкг/мл	2,33	5,14	9,88	21,72	43,65
RSD, % (не более 10%)	6,51	7,83	4,08	6,99	3,49
Степень извлечения, % (80-120%)	93,33	102,81	98,77	108,6	109,13
Расчетный коэффициент Стьюдента, t (Табличный коэффициент Стьюдента, (0,05;2) 4,303)	-1,9	0,6	-0,53	1,96	4,16

Среднее значение степени извлечения для всех модельных растворов находилось в диапазоне от 93,33 до 109,13 %, что соответствовало критерию приемлемости (80-120%).

Результаты оценки линейности показали, что зависимость строго линейна, расчетная величина коэффициента корреляции составила 0,9996. Это свидетельствует о том, что в данных интервалах концентраций методика обеспечивает определение PRP в Hib-вакцине с требуемой линейностью.

Для изучения сходимости метода проводили шесть последовательных анализов раствора Hib-вакцины и рассчитывали величину RSD, которая не должна превышать 5%.

Данные по оценке сходимости метода показали, что RSD результатов определения концентрации PRP не превышало 3,58 %, что свидетельствовало о точности методики. Результаты оценки сходимости метода представлены в таблице 44.

Таблица 44

Результаты определения сходимости колориметрического метода с орциноловым реактивом

№ измерения	1	2	3	4	5	6	Среднее	RSD, %
Концентрация PRP, мг/мл	9,80	10,20	10,54	9,96	10,16	9,50	10,03	3,58

При определении влияния внутрилабораторных вариаций три исследователя анализировали в трех повторах в различные дни раствор Hib-вакцины и рассчитывали величину RSD, которая для каждого исполнителя и между исполнителями не должна превышать 10%.

Средняя величина относительного стандартного отклонения при оценке внутрилабораторных вариаций для каждого из исполнителей составила 5,83%, между исполнителями 8,06%. Результаты определения внутрилабораторной прецизионности метода представлены в таблице 45.

Результаты определения внутрилабораторной прецизионности
колориметрического метода с орциоловым реактивом

День	Концентрация PRP, мкг/доза		
	Исполнитель 1	Исполнитель 2	Исполнитель 3
1	9,97	10,62	9,19
2	9,60	11,84	8,68
3	10,05	10,23	10,03
Среднее	9,87	10,90	9,30
RSD %	2,46	7,71	7,32
Среднее	10,02		
RSD %	8,06		

Результаты показали, что в диапазоне концентраций рибозы от 2,5 мкг/мл до 40 мкг/мл методика обладает высокой чувствительностью, точностью, воспроизводимостью и может быть рекомендована для количественного определения конъюгированного и свободного PRP в конъюгированных Нib-вакцинах.

Основные валидационные характеристики метода представлены в таблице 46.

Таблица 46

Основные валидационные характеристики колориметрического метода
с орциоловым реактивом

Аналитическая характеристика	Результаты
Правильность	93,33 - 109,21 %
Линейность (коэффициент корреляции)	$r = 0,9996$
Диапазон применения	От 2,5 до 40 мкг/мл
Сходимость	3,58 %
Внутрилабораторная прецизионность (для каждого исполнителя)	2,46; 7,71; 7,32 %
Внутрилабораторная прецизионность (между исполнителями)	8,06%

Метод контроля специфической активности лиофилизированной синтетической Нib-вакцины по количественному содержанию

конъюгированного и свободного PRP включен в проекты НД на вакцины АКДС-Геп В+Ніb и аАКДС-Геп В+Ніb⁵.

4.4. Определение содержания конъюгированного столбнячного анатоксина (белок) в Ніb-вакцине

Определение содержания белка-носителя столбнячного анатоксина в исследуемых сериях Ніb-вакцины проводили методом Лоури без предварительного осаждения белка (Метод А).

Как известно, при определении белка фотометрическим методом углеводы, присутствующие в исследуемом растворе в концентрации, значительно превышающей концентрацию белка, оказывают мешающее влияние на результат анализа. Поэтому перед определением столбнячного анатоксина в образцах вакцины проводили стадию пробоподготовки описанным выше способом (см. раздел 4.3).

В таблице 47 представлены результаты определения белка в исследуемых сериях Ніb-вакцины, полученные с помощью метода Лоури, применяя разработанный способ пробоподготовки.

Таблица 47

Результаты количественного определения конъюгированного столбнячного анатоксина в исследуемых сериях Ніb-вакцины

№ серии	Содержание белка, мкг/мл
1	48,6±0,20
2	49,0±0,10
3	50,6±0,11
4	52,0±0,14
5	50,0±0,08
6	50,0±0,10

⁵ Материал опубликован в статье: Белякова, О.В. Разработка и валидация методики определения полирибозилрибитола фосфата в конъюгированных вакцинах для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b // Биофармацевтический журнал. - 2015. - Т. 7, № 2. - С. 17–21.

4.5. Определение подлинности Hib-вакцины

При контроле подлинности конъюгированных Hib-вакцин следует проводить оценку подлинности, как полисахарида, так и белка-носителя.

Определение подлинности PRP

Подлинность полисахарида определяли в реакции с орциноловым реактивом после проведения стадии пробоподготовки по образованию зеленого окрашивания в результате взаимодействия гидролизованной формы рибозы полирибозилрибитола фосфата с орцином в присутствии соли железа (III).

Определение подлинности белка-носителя

Для определения подлинности белка-носителя конъюгированной Hib-вакцины был использован оригинальный метод, основанный на РКОА с использованием диагностикума на основе аффинноочищенных антител кролика против столбнячного анатоксина, сорбированных на белке А инактивированного стафилококка штамма Cowan I [30].

Оценку подлинности столбнячного анатоксина проводили с помощью диагностикума, входящего в состав тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов «ТН-ДСК-КОА» [6, 29].

Пригодность метода для определения подлинности белка-носителя конъюгированных Hib-вакцин с помощью тест-набора «ТН-ДСК-КОА» была подтверждена ранее в ходе валидационных исследований по оценке чувствительности, прецизионности (сходимости и воспроизводимости) и специфичности тест-набора [30]. Установлено, что минимально определяемое количество столбнячного анатоксина с использованием набора «ТН-ДСК-КОА» составило $0,049 \pm 0,014 \text{ Lf/мл}$.

Данные, полученные при оценке подлинности лиофилизированной Hib-вакцины, представлены в таблице (табл. 48).

Оценка конъюгированных Нib-вакцин по показателю «Подлинность»

Образец	№ измерения	Столбнячный анатоксин	Полисахарид
		ДС	Орцинол
Нib-вакцина с.1	1	++++	+
	2	++++	+
	3	++++	+
Нib-вакцина с.2	1	++++	+
	2	++++	+
	3	++++	+
Нib-вакцина с.3	1	++++	+
	2	++++	+
	3	++++	+
Нib-вакцина с.4	1	++++	+
	2	++++	+
	3	++++	+
Нib-вакцина с.5	1	++++	+
	2	++++	+
	3	++++	+
Нib-вакцина с.6	1	++++	+
	2	++++	+
	3	++++	+

Примечание: АС – анатоксин столбнячный; ФБР – фосфатный буферный раствор; ДС – диагностикум столбнячный.

В результате проведенных испытаний было показано, что набор реагентов «ТН-ДСК-КОА» позволяет достоверно определять подлинность белка-носителя столбнячного анатоксина в составе исследованных конъюгированных вакцин.

Кроме того, была исследована возможность использования РКООА как полуколичественного метода для ориентировочного определения содержания белка-носителя в конъюгированных Нib-вакцинах (табл. 49).

Результаты определения столбнячного анатоксина (белка-носителя) в составе конъюгированных вакцин

Вакцина или компонент	Результаты РКОА						
	Разведение вакцины						Содержание столбнячного анатоксина по РКОА, Lf/мл
	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	
Акт-ХИБ®	++++	++++	++++	+++	++	-	3,8
Кими-Хиб®	++++	++++	++++	++++	+++	++	3,8
Ніb-вакцина с.1	++++	++++	++++	+++	++	-	3,8
Ніb-вакцина с.2	++++	++++	++++	+++	++	-	3,8
Ніb-вакцина с.3	++++	++++	++++	+++	++	-	3,8
Ніb-вакцина с.4	++++	++++	++++	+++	++	-	3,8
Ніb-вакцина с.5	++++	++++	++++	+++	++	-	3,8
Ніb-вакцина с.6	++++	++++	++++	+++	++	-	3,8

Таким образом, нами была подтверждена возможность применения методов контроля подлинности полисахарида в реакции с орциноловым реактивом и подлинности белка-носителя Ніb-вакцины в РКОА с применением набора «ТН-ДСК-КОА». Методы контроля подлинности были включены в проекты НД на вакцины АКДС-Геп В+Ніb и аАКДС-Геп В+Ніb.

4.6. Определение иммуногенности Ніb-вакцины

Иммуногенную активность Ніb-вакцины оценивали в тесте «in vivo» на кроликах. В качестве растворителя для лиофилизированной Ніb-вакцины использовали воду для инъекций (непосредственно перед иммунизацией содержимое каждой ампулы с Ніb-вакциной растворяли в 0,5 мл воды для инъекций).

Результаты исследования иммуногенности шести серий Ніb-вакцины представлены в таблице 50.

Иммуногенные свойства лиофилизированной Ніб-вакцины

№ серии	Количество животных	Доза PRP, мкг	% сероконверсии (не менее 50%) ¹
1	4	10	100
2	4	10	100
3	4	10	100
4	4	10	100
5	4	10	100
6	4	10	100

Примечание: 1 - требования ВОЗ

Из представленных данных следует, что иммунизация кроликов Ніб-вакциной приводила к образованию антител к полисахариду *H. influenzae* тип *b* у 100% привитых животных.

Кроме того, специфическую активность Ніб-вакцины оценивали по содержанию специфических антител в крови животных, при этом оценивали иммунный ответ как на Ніб антиген, так и на белок-носитель столбнячный анатоксин.

В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие вакцины для профилактики Ніб-инфекции: Акт-ХИБ® (производства Sanofi Pasteur, Франция) и Кими-Хиб® (производства HeberBiotec, Республика Куба). Результаты определения уровня специфических антител в сыворотках крови иммунизированных животных представлены в таблице 51.

Таблица 51

Иммуногенность конъюгированных Ніб-вакцин в опытах на кроликах
(средняя геометрическая титра)

Наименование образца	Компоненты вакцин	
	Столбнячный, МЕ/мл	Ніб, мкг/мл
1	2	3
Акт-ХИБ® с. G1012-2	0,046 [0,008-0,266]	17,191 [2,990-97,750]
Хиберикс® с. 12060709	0,050 [0,020-0,140]	15,900 [6,600-38,200]
Кими-Хиб® с. ОН1302/0	0,040 [0,008-0,191]	15,284 [7,293-32,033]

1	2	3
НіВ-вакцина с. 1	0,040 [0,010-0,120]	16,910 [2,05-89,21]
НіВ-вакцина с. 2	0,043 [0,014-0,130]	15,300 [7,300-32,000]
НіВ-вакцина с. 3	0,115 [0,078-0,169]	12,434 [4,796-32,232]
НіВ-вакцина с. 4	0,040 [0,010-0,090]	18,200 [6,100-44,800]
НіВ-вакцина с. 5	0,040 [0,016-0,110]	15,400 [8,200-36,100]
НіВ-вакцина с. 6	0,043 [0,004-0,092]	24,400 [8,600-50,900]

Из полученных данных следует, что лиофилизированная НіВ-вакцина стимулирует выработку антител к полирибозилрибитол фосфату у кроликов на уровне, сопоставимом с коммерческими моновакцинами (Акт-ХИБ® и Кими-Хиб®), при этом иммунный ответ на столбнячный анатоксин минимален, что отвечает требованиям Европейской Фармакопеи, предъявляемым к белкам-носителям конъюгированных вакцин.

4.7. Изучение специфической безопасности НіВ-вакцины

Проведение исследования специфической безопасности НіВ-вакцины обосновано наличием в составе вакцины белка-носителя столбнячного анатоксина. При определении специфической безопасности столбнячного анатоксина руководствовались требованиями ФС «Анатоксин столбнячный адсорбированный (АС-анатоксин)» [24].

В течение всего срока наблюдения (21 сутки) у животных не наблюдалось признаков столбняка и снижения массы тела, ни одно животное не погибло, что свидетельствовало о безопасности препарата.

Результаты изучения специфической безопасности на морских свинках представлены в таблице 52

Результаты изучения специфической безопасности Нib-вакцины на
морских свинках

№ животного	Вес до введения	Дата учета (через 21 день после введения)	Вес через 21 день после введения
1	330	28.03.13	430
2	320	28.03.13	480
3	340	28.03.13	510
4	330	28.03.13	440
5	330	28.03.13	470

4.8. Характеристика готовой лекарственной формы Нib-вакцины с помощью фармакопейных методов

При помощи фармакопейных методов анализа лекарственных препаратов были изучены следующие показатели качества Нib-вакцины: рН раствора образцов, наличие механических включений, потеря в массе при высушивании, аномальная токсичность, стерильность, пирогенность.

Для определения рН, осмоляльности и аномальной токсичности исследуемые лиофилизированные образцы растворяли в 0,5 мл воды для инъекций.

Все полученные образцы Нib-вакцины были однородны по внешнему виду и представляли собой аморфную массу белого цвета, легко растворимую при добавлении воды для инъекций. В полученных образцах видимые механические включения отсутствовали. Исследуемые серии были стерильны.

Для определения пирогенности исследуемые лиофилизированные образцы растворяли в 0,5 мл физиологического раствора и вводили в ушную вену кролика в дозе 0,1 мкг PRP на кг массы животного за период времени не более 2 мин. Результаты исследования пирогенных свойств Нib-вакцины в опытах на кроликах представлены в таблице 53. Суммарное изменение температуры тела животных после введения вакцины по сравнению с

исходным значением не превышало 0,7 °С, что свидетельствовало об апирогенности исследуемых серий Hib-вакцины.

Таблица 53

Определение пирогенности исследуемых серий Hib-вакцины на кроликах

Препарат	Номер кролика	Масса кролика, кг	Температура перед введением препарата, °С	Суммарное изменение температуры после введения вакцины, °С
Hib-вакцина с. 1	1	2,00	39,40	0,70
	2	2,10	39,20	
	3	2,15	39,40	
Hib-вакцина с. 2	1	2,05	39,20	0,60
	2	2,10	39,20	
	3	2,10	39,10	
Hib-вакцина с. 3	1	2,60	39,40	0,50
	2	3,00	39,20	
	3	3,60	39,40	
Hib-вакцина с. 4	1	2,20	39,10	0,60
	2	2,25	39,20	
	3	2,20	39,30	
Hib-вакцина с. 5	1	2,20	39,30	0,20
	2	2,40	39,20	
	3	2,45	39,20	
Hib-вакцина с. 6	1	2,35	39,40	0,60
	2	2,35	39,40	
	3	2,05	39,40	

При изучении аномальной токсичности исследуемый препарат вводили белым мышам внутривенно, морским свинкам – подкожно в объеме, соответствующем разовой дозе, рекомендуемой для человека (10 мкг PRP в дозе). В течение всего срока наблюдения (7 суток) у подопытных животных не проявлялось признаков интоксикации и снижения массы тела. Ни одно животное не погибло. Таким образом, исследуемые серии Hib-вакцины не обладали токсическим действием.

4.9. Исследование стабильности Нib-вакцины при хранении

Исследование стабильности лиофилизированной Нib-вакцины проводили в соответствии с требованиями международных и отечественных нормативных документов [3, 4, 24, 49, 116, 117, 190].

Исследование стабильности включало проведение следующих экспериментов:

1. Стресс-исследования при экстремальных температурах;
2. Исследование стабильности методом ускоренного старения;
3. Долгосрочные исследования стабильности.

Стресс-исследование стабильности выполняли на одной серии Нib-вакцины (серия 6). В процессе исследования образцы Нib-вакцины хранили при температуре (50 ± 2) и (60 ± 2) °C в защищенном от света месте и анализировали в следующие сроки: 2, 8, 12, 19 суток. Контроль качества препарата проводили по следующим показателям: внешний вид, растворимость, подлинность, содержание свободного и конъюгированного PRP. Результаты испытаний представлены в Приложении Б (табл. 54).

Стресс-исследование стабильности продемонстрировало, что хранение Нib-вакцины при температуре 60 °C приводило к изменению внешнего вида лиофилизата и к увеличению времени растворения, что не соответствовало установленным спецификациям по качеству. Такие же изменения наблюдались при хранении вакцины при температуре 50 °C в течение 12 и более суток. Тем не менее, анализ хроматографических профилей этих образцов и вакцины, хранившейся при температуре от 2 до 8 °C, не выявил изменений молекулярных параметров конъюгата PRP-столбнячный анатоксин. Исследуемые образцы вне зависимости от условий хранения элюировали с колонки одним основным пиком со временем удерживания около 14,7 мин и константой распределения (K_d) 0,37, площадь основного пика менялась незначительно. Были обнаружены небольшие изменения в содержании свободного PRP в исследуемых образцах, которые находились в допустимых пределах.

Для исследования стабильности методом «ускоренного старения» были отобраны 3 серии лиофилизированной Ніб-вакцины, полученные из разных серий субстанции Ніб (серии 1, 3, 5, полученные из Ніб субстанции серий 53IFA1110, 53IFA1205, 53IFA1210 соответственно). В процессе исследования образцы Ніб-вакцины хранили при температуре (37 ± 2) °С в защищенном от света месте.

В соответствии с ОФС «Сроки годности лекарственных средств» [24] согласно зависимостям 6 и 7 был установлен максимальный срок хранения образцов Ніб-вакцины и период контроля качества, эквивалентный 6 месяцам хранения при температуре от 2 до 8 °С.

Согласно правилу Вант-Гоффа (6), значение коэффициента соответствия (К) для разности температур экспериментального (37 ± 2) °С и предполагаемого хранения от 2 до 8 °С составило 20,57.

$$K = A^{\frac{t_{\text{э}} - t_{\text{хр.}}}{10}}, \text{ где} \quad (6)$$

$t_{\text{э}}$ – температура экспериментального хранения,

$t_{\text{хр}}$ – температура хранения,

A – температурный коэффициент скорости химической реакции при увеличении температуры на 10 °С (принят равным 2,5).

Период времени, через который осуществляли контроль препарата по показателям качества, был вычислен на основании зависимости (7) и составил 8,75 суток.

$$C = K \times C_{\text{э}}, \text{ где} \quad (7)$$

C – срок годности при температуре хранения,

$C_{\text{э}}$ – экспериментальный срок годности.

Поскольку срок годности, установленный с помощью метода «ускоренного старения», не должен превышать трех лет, максимальный срок хранения образцов Ніб-вакцины составил 53 суток.

Таким образом, контроль препарата в ходе исследования стабильности методом «ускоренного старения» проводили на 9; 18; 27; 35; 44; 53 сутки

хранения при температуре (37 ± 2) °С по следующим показателям: описание, подлинность, рН, осмоляльность, растворимость, потеря в массе при высушивании, стерильность, аномальная токсичность, специфическая безопасность, специфическая активность и содержание свободного PRP. Результаты испытаний представлены в Приложении Б (табл. 55).

Исследование специфической активности вакцины на протяжении всего периода хранения при (37 ± 2) °С показало, что иммунизация кроликов исследуемыми образцами вакцины приводила к формированию иммунного ответа у 100 % привитых животных. Содержание свободного PRP также находилось пределах установленного диапазона и не превышало 12% от номинального содержания. Значения рН и осмоляльности оставались стабильными для всех образцов и находились в диапазоне 7,0-7,14 и 368-402 мОсмоль/кг соответственно.

Результаты исследования стабильности Ніб-вакцины методом «ускоренного старения» показали, что вакцина остается стабильной в течение 53 суток хранения при температуре (37 ± 2) °С, что соответствует 1090 суткам или 3 годам хранения при температуре от 2 до 8 °С.

Для долгосрочного исследования стабильности были отобраны 3 серии лиофилизированной Ніб-вакцины, полученные из разных серий субстанции Ніб (серии 1, 3, 5, полученные из Ніб субстанции серий 53IFA1110, 53IFA1205, 53IFA1210 соответственно). В процессе исследования образцы Ніб-вакцины хранили при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте и анализировали в следующие сроки: 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36 месяцев. Контроль качества препарата проводили по следующим показателям: описание, подлинность, рН, осмоляльность, растворимость, потеря в массе при высушивании, стерильность, аномальная токсичность, специфическая безопасность, специфическая активность и содержание свободного PRP. Результаты испытаний представлены в Приложении Б (табл. 56).

Проведенные долгосрочные исследования стабильности показали, что лиофилизированная Ніб-вакцина соответствовала всем установленным

требованиям к качеству на протяжении всего срока наблюдения (3 года) в условиях хранения при температуре от 2 до 8 °С: содержание связанного PRP соответствовало норме, установленной Европейской Фармакопеей, содержание свободного полисахарида не превышало 20% от номинальной величины. Кроме того, при контроле образцов вакцины после хранения при температуре от 2 до 8 °С по показателю специфическая активность в тесте «in vivo» сероконверсия составляла 100% на протяжении всего срока наблюдения.

Благодаря тщательно подобранной буферной системе и режиму лиофильного высушивания синтетическая Hib-вакцина является высокостабильным препаратом и сохраняет свои свойства не менее 3-х лет после производства.

Таким образом, на основании проведенных исследований стабильности для лиофилизированной Hib-вакцины был установлен срок годности, составляющий 3 года хранения при температуре от 2 до 8 °С⁶.

Результаты всесторонних исследований послужили основанием для разработки спецификации качества на лиофилизированную синтетическую Hib-вакцину, максимально отражающую все требования, предъявляемые Европейской Фармакопеей и ВОЗ к конъюгированным Hib-вакцинам. Проект спецификации представлен в таблице 57.

Разработанные и прошедшие валидацию методы контроля Hib-вакцины были включены в проекты фармакопейных статей предприятия на пентавакцины АКДС-ГепВ+Hib и аАКДС-ГепВ+Hib.

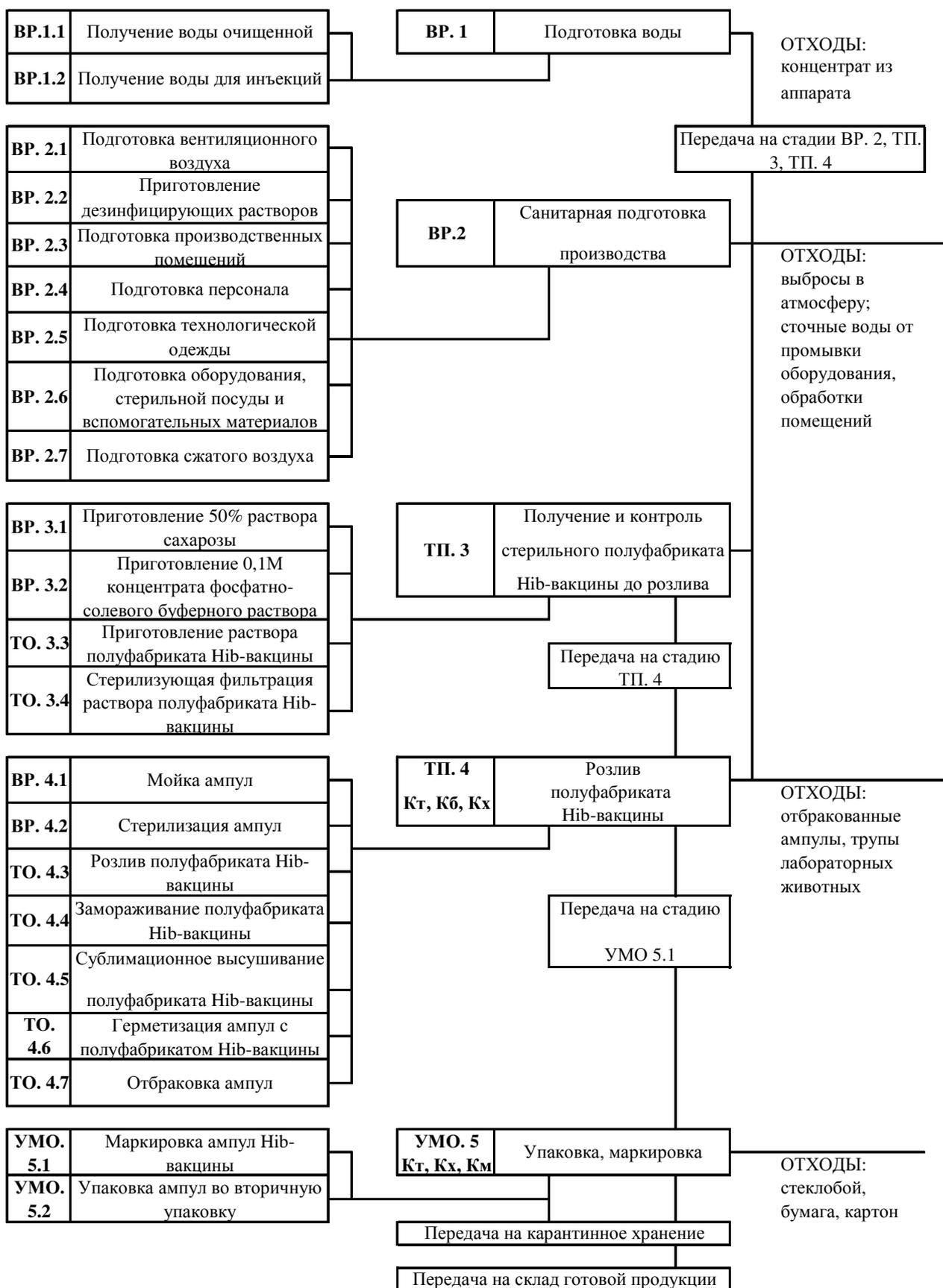
Итогом проведенных исследований стала разработка технологии производства лиофилизированной синтетической Hib-вакцины. Технологическая схема представлена на рис. 20.

⁶ Материал опубликован в статьях: Белякова, О.В. Изучение стабильности и установление сроков годности лиофилизированной синтетической вакцины для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа *b* // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 120-летию филиала АО НПО «Микроген» в г. Пермь Пермского Научно-производственного объединения «Биомед». – Пермь, 2018. – С. 30-37 и Белякова, О.В. Разработка и стандартизация лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа *b* / О.В. Белякова, А.М. Николаева, О.Ю. Соснина, О.С. Дрожжачих // Пермский медицинский журнал. – 2014. – Т.2, №31. – С. 102–108

Спецификация лиофилизированной Hib-вакцины

Показатели	Методы (контроля)	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный	Аморфная масса белого цвета
Подлинность Полисахарид	Колориметрический с орцином	Должно наблюдаться окрашивание раствора препарата в зеленый цвет.
Белок-носитель	Реакция коагуляции (РКОА)	Должны образовываться агглютинаты со столбнячным диагностикумом.
Механические включения	Визуальный, ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0005.15	Видимые механические включения должны отсутствовать.
pH	Потенциометрический, ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0004.15	От 6,4 до 7,4
Осмоляльность	Криоскопический, ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0003.15	Не менее 200 мОсмоль/кг
Растворимость	Визуальный, ГФ XIII, ОФС.1.8.1.0002.15	Должен полностью растворяться в 0,5 мл воды для инъекций в течение 1-2 мин
Потеря в массе при высушивании	Весовой, ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0010.15	Не более 3 %
Стерильность	Микробиологический (метод прямого посева), ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0003.15	Должен быть стерильным
Пирогенность	Биологический, ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0005.15	Должен быть апиrogenным
Аномальная токсичность	Биологический, ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0004.15	Должен быть нетоксичным
Специфическая безопасность	Биологический	Должен быть безопасным
Специфическая активность Иммуногенность	Биологический	Должен вызывать выработку антител не менее чем у 50 % животных (кроликов).
Содержание PRP	Колориметрический с орцином	Должно быть в пределах ± 20 % от номинальной величины.
Содержание свободного PRP	Расчетный/ Колориметрический с орцином	Не более 20 %

1	2	3
Содержание конъюгированного столбнячного анатоксина (белок)	Метод Лоури без предварительного осаждения ГФ XIII, ОФС.1.2.3.0012.15	От 40 до 62 мкг/мл
Упаковка		По одной прививочной дозе в ампулах из стекла.
Хранение		При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с СП 3.3.2.3332-16. Замораживание не допускается
Срок годности		36 мес



Кт – контроль технологический;
 Кх – контроль химический;
 Км – контроль микробиологический.

Рис. 20. Технологическая схема производства Hib-вакцины.

Технологический процесс получения Ніб-вакцины состоит из следующих основных этапов:

1. Приготовление раствора полуфабриката Ніб-вакцины, содержащего 20 мкг/мл полирибозилрибитола фосфата, 8,5% сахарозы и 0,01М натрий-фосфатного буфера. Процесс контролируется по показателям рН и осмоляльность;

2. Стерилизующая фильтрация раствора полуфабриката Ніб-вакцины через фильтры с капроновыми мембранами с размером пор 0,45 и 0,22 мкм;

3. Розлив стерильного раствора полуфабриката Ніб-вакцины с помощью автоматической разливочной машины «БОШ AVRФ-0,4» по 0,5 мл препарата в ампулы ШП-2;

4. Лиофильное высушивание на аппарате ТГ-50;

5. Герметизация ампул на машине для запайки А6/FA «MACOFAR», проверка всех запаянных ампул на герметичность;

6. Отбраковка ампул на столе для просмотра ампул, проверяют на целостность, внешний вид, качество розлива, запайки.

7. Контроль готового продукта по показателям: растворимость, рН, осмоляльность, стерильность, пирогенность, потеря в массе при высушивании, подлинность, количественное содержание конъюгированного и свободного PRP, специфическая активность в тесте на животных.

По разработанной технологии были произведены 6 серий лиофилизированной Ніб-вакцины на основе субстанции синтетического полирибозилрибитола фосфата, конъюгированного со столбнячным анатоксином. Полученные серии Ніб-вакцины вызывают выработку антител в сыворотке крови иммунизированных животных к полисахариду Ніб, сохраняют специфическую активность в течение заявленного срока хранения, что отвечает требованиям национальных регулирующих документов, ВОЗ и Европейской фармакопеи, предъявляемым к конъюгированным Ніб-вакцинам. Результаты контроля произведенных серий препарата по основным показателям представлены в таблице 58.

Таблица 58

Результаты контроля Нiв-вакцины в соответствии со спецификацией

Серия, №	Описание	Подлинность PRP	Подлинность белка-носителя	Механические включения	pH	Осмоляльность, мОсмоль/кг	Растворимость	Потеря в массе при высушивании, %	Стерильность	Пирогенность	Аномальная токсичность	Специфическая безопасность	Специфическая активность	Содержание свободного PRP, %	Содержание конъюгированного столбнячного анатоксина, мкг/мл
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Отс.	7,10	378	Соотв.	1,41	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	Вызывает выработку антител у <u>100</u> % кроликов Содержание PRP <u>94,20</u> % от номинальной величины	5,80	48,60
2	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Отс.	6,60	341	Соотв.	1,90	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	Вызывает выработку антител у <u>100</u> % кроликов Содержание PRP <u>88,30</u> % от номинальной величины	11,70	49,00
3	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Отс.	7,10	370	Соотв.	1,50	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	Вызывает выработку антител у <u>100</u> % кроликов Содержание PRP <u>99,20</u> % от номинальной величины	0,80	50,60
4	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Отс.	6,80	345	Соотв.	1,20	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	Вызывает выработку антител у <u>100</u> % кроликов Содержание PRP <u>97,80</u> % от номинальной величины	2,20	52,00
5	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Отс.	7,00	402	Соотв.	2,10	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	Вызывает выработку антител у <u>100</u> % кроликов Содержание PRP <u>91,10</u> % от номинальной величины	8,90	50,00
6	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Отс.	6,60	348	Соотв.	2,30	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	Вызывает выработку антител у <u>100</u> % кроликов Содержание PRP <u>96,90</u> % от номинальной величины	3,10	50,00

Примечание: Соотв. – соответствует установленным требованиям; Отс. - отсутствуют.

ГЛАВА 5. ЛАБОРАТОРНО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ СИНТЕТИЧЕСКОЙ КОНЬЮГИРОВАННОЙ НІВ-ВАКЦИНЫ

Внедрение современных препаратов в клиническую практику осуществимо лишь при условии детального изучения их специфической фармакологической активности и безопасности на этапе экспериментальных исследований [50].

В связи с этим целью следующего этапа работы являлось установление характера и выраженности повреждающего действия лиофилизированной синтетической конъюгированной Ніб-вакцины на организм экспериментальных животных и оценка ее безопасности. Исследование общетоксического действия проводили при однократном введении вакцины в тесте «острой» токсичности и при длительном введении в тесте «хронической» токсичности.

5.1. Изучение «острой» и «хронической» токсичности Ніб-вакцины

Результаты наблюдения показали, что как однократное так и многократное введение Ніб-вакцины в количестве 10 и 100 доз не вызывало гибели животных, не приводило к снижению массы тела, изменениям волосяного покрова. В течение всего периода наблюдения за подопытными и контрольными животными не было выявлено видимых признаков изменения общего клинического состояния: внешний вид, поведенческие реакции, двигательная активность, а также потребление корма и воды у животных всех групп существенно не отличались и соответствовали норме для данного вида животных.

Был проведен статистический анализ массы тела животных, прироста массы и проведена оценка достоверности полученных результатов с помощью *t* критерия Стьюдента. На протяжении всего эксперимента у животных всех групп наблюдался прирост массы тела. Статистически значимых различий между опытными и контрольными группами выявлено не

было. Результаты анализа массы тела животных при изучении «острой» и «хронической» токсичности Нib-вакцины представлены в таблицах 59 и 60.

Макроскопическое исследование внутренних органов б/п мышей не выявило различий между животными опытных и контрольных групп, внутренние органы всех животных имели все характерные признаки, расположение и строение. Оболочки, выстилающие внутренние полости, влажные, серовато-розового цвета, без признаков воспаления. Результаты анализа масс внутренних органов животных при изучении «острой» и «хронической» токсичности Нib-вакцины представлены в таблицах 61 и 62.

Статистически значимых различий коэффициентов масс внутренних органов животных опытных групп по сравнению с контрольной выявлено не было.

Таким образом, на основании полученных результатов изучения общетоксического действия лиофилизированной Нib-вакцины не установлено признаков токсического воздействия препарата на организм подопытных животных.

Изменение массы тела б/п мышей при изучении «острой» токсичности
Нiв-вакцины на момент эвтаназии

Срок эвтаназии	Группа	Масса тела, г					N
		исходная	24 часа	7 суток	14 суток	прирост	
24 часа	Контроль (раствор натрия хлорида 0,9 %)	15,57± 0,77	15,61± 0,87			0,04± 0,31	10
	Нiв-вакцина с. 1 (при введении 10 доз)	15,88± 0,89	15,93± 1,00			0,05± 0,38	10
	Нiв-вакцина с. 1 (при введении 100 доз)	15,08± 0,61	15,17± 0,91			0,09± 0,33	10
7 суток	Контроль (раствор натрия хлорида 0,9 %)	15,42± 0,65		18,81± 1,12		3,39± 1,33	10
	Нiв-вакцина с. 1 (при введении 10 доз)	15,86± 0,68		19,41± 1,04		3,55± 1,33	10
	Нiв-вакцина с. 1 (при введении 100 доз)	15,10± 0,60		18,17± 1,87		3,07± 1,40	10
14 суток	Контроль (раствор натрия хлорида 0,9 %)	15,05± 0,39			20,84± 1,15	5,79± 1,39	10
	Нiв-вакцина с. 1 (при введении 10 доз)	15,02± 0,68			21,41± 1,04	6,39± 1,19	10
	Нiв-вакцина с. 1 (при введении 100 доз)	15,03± 0,66			21,32± 1,59	6,29± 1,43	10

M ± m - среднее арифметическое ± стандартное отклонение

Статистически значимых различий между опытными и контрольной группами не выявлено (p>0,05)

Изменение массы тела б/п мышей при изучении «хронической» токсичности Ніб-вакцины на момент эвтаназии.

Срок эвтаназии	Группа	Масса тела, г					N
		исходная	24 часа	7 суток	14 суток	прирост	
24 часа	Контроль (раствор натрия хлорида 0,9 %)	16,38± 1,86	21,41± 2,14			5,03± 0,71	10
	Ніб-вакцина с. 1 (при введении 10 доз)	16,50± 0,33	22,05± 0,62			5,55± 0,64	10
	Ніб-вакцина с. 1 (при введении 100 доз)	17,65± 0,72	22,84± 1,05			5,19± 0,77	10
7 суток	Контроль (раствор натрия хлорида 0,9 %)	16,42± 1,48		25,37± 0,78		8,95± 1,17	10
	Ніб-вакцина с. 1 (при введении 10 доз)	16,81± 0,65		25,22± 1,24		8,41± 1,11	10
	Ніб-вакцина с. 1 (при введении 100 доз)	17,02± 0,44		25,56± 1,07		8,54± 1,26	10
14 суток	Контроль (раствор натрия хлорида 0,9 %)	17,12± 0,91			29,17± 0,58	12,05± 0,82	10
	Ніб-вакцина с. 1 (при введении 10 доз)	16,81± 0,65			28,42± 1,48	11,61± 1,40	10
	Ніб-вакцина с. 1 (при введении 100 доз)	17,02± 0,44			28,98 ± 1,70	11,96± 1,64	10

$M \pm m$ - среднее арифметическое \pm стандартное отклонение

Статистически значимых различий между опытными и контрольными группами не выявлено ($p > 0,05$)

Таблица 61

Динамика коэффициентов масс органов б/п мышей при изучении «острой» токсичности Нib-вакцины

Срок эвта- назии	Группа	Коэффициент массы органа ((массы органа, г/массы тела животного, г)×100 %)						N
		сердце	тимус	печень	селезенка	Почки	легкие	
24 Часа	Контроль (раствор натрия хлорида 0,9 %)	0,80± 0,15	0,44± 0,09	6,18± 0,82	0,53± 0,08	0,72± 0,10	1,02± 0,13	10
	Нib-вакцина с. 1 (при введении 10 доз)	0,84± 0,21	0,52± 0,10	5,47± 0,53	0,54± 0,14	0,79± 0,21	1,09± 0,12	10
	Нib-вакцина с. 1 (при введении 100 доз)	0,71± 0,15	0,53± 0,11	5,68± 0,39	0,62± 0,11	0,82± 0,12	1,12± 0,07	10
7 суток	Контроль (раствор натрия хлорида 0,9 %)	0,65± 0,12	0,57± 0,10	6,88± 0,83	0,62± 0,08	0,66± 0,09	1,12± 0,24	10
	Нib-вакцина с. 1 (при введении 10 доз)	0,70± 0,17	0,48± 0,09	6,14± 0,67	0,71± 0,16	0,70± 0,07	1,02± 0,11	10
	Нib-вакцина с. 1 (при введении 100 доз)	0,70± 0,17	0,49± 0,10	6,41± 0,54	0,77± 0,20	0,74± 0,09	1,18± 0,18	10
14 суток	Контроль (раствор натрия хлорида 0,9 %)	0,74± 0,11	0,51± 0,09	6,21± 0,74	0,62± 0,09	0,71± 0,10	1,10± 0,21	10
	Нib-вакцина с. 1 (при введении 10 доз)	0,71± 0,15	0,52± 0,08	6,01± 0,48	0,64± 0,14	0,72± 0,10	1,11± 0,11	10
	Нib-вакцина с. 1 (при введении 100 доз)	0,70± 0,09	0,52± 0,10	6,12± 0,67	0,67± 0,21	0,72± 0,09	1,10± 0,20	10

$M \pm m$ - среднее арифметическое \pm стандартное отклонение.

Статистически значимых различий между опытными и контрольной группами не выявлено ($p > 0,05$)

Таблица 62

Динамика коэффициентов масс органов б/п мышей при изучении «хронической» токсичности Нib-вакцины.

Срок эвта-назии	Группа	Коэффициент массы органа ((массы органа, г/массы тела животного, г)×100 %)						
		сердце	тимус	печень	селезенка	Почки	легкие	N
24 Часа	Контроль (раствор натрия хлорида 0,9 %)	0,55± 0,12	0,32± 0,09	5,77± 1,79	0,46± 0,11	0,58± 0,12	0,95± 0,15	10
	Нib-вакцина с. 1 (при введении 10 доз суммарно)	0,51± 0,16	0,31± 0,10	4,65± 0,68	0,51± 0,18	0,49± 0,14	0,80± 0,14	10
	Нib-вакцина с. 1 (при введении 100 доз суммарно)	0,51± 0,08	0,36± 0,14	4,71± 0,58	0,48± 0,15	0,46± 0,10	0,82± 0,10	10
7 Суток	Контроль (раствор натрия хлорида 0,9 %)	0,68± 0,06	0,37± 0,03	6,07± 0,86	0,58± 0,08	0,62± 0,08	1,03± 0,13	10
	Нib-вакцина с. 1 (при введении 10 доз суммарно)	0,65± 0,09	0,38± 0,05	6,00± 1,04	0,59± 0,09	0,64± 0,09	1,08± 0,14	10
	Нib-вакцина с. 1 (при введении 100 доз суммарно)	0,59± 0,11	0,42± 0,13	5,75± 0,39	0,59± 0,15	0,63± 0,12	1,03± 0,08	10
14 Суток	Контроль (раствор натрия хлорида 0,9 %)	0,59± 0,06	0,32± 0,03	5,76± 0,44	0,61± 0,10	0,63± 0,08	0,93± 0,09	10
	Нib-вакцина с. 1 (при введении 10 доз суммарно)	0,58± 0,07	0,33± 0,04	5,31± 0,78	0,64± 0,13	0,57± 0,08	0,96± 0,12	10
	Нib-вакцина с. 1 (при введении 100 доз суммарно)	0,60± 0,08	0,37± 0,11	5,24± 0,57	0,64± 0,18	0,63± 0,11	0,92± 0,12	10

M ± m - среднее арифметическое ± стандартное отклонение.

Статистически значимых различий между опытными и контрольными группами не выявлено (p>0,05)

5.2. Изучение местного раздражающего действия Ніб-вакцины

Для изучения местного раздражающего действия исследуемый препарат в дозе 5,2 мкг (1 доза для ребенка в пересчете на кролика) вводили в один глаз кроликов, в другой глаз вводили эквивалентный объем контрольного препарата (раствора натрия хлорида 0,9%). Реакция регистрировали через 24, 48, 72 часа и 7 суток.

В течение всего времени наблюдения расширения сосудов конъюнктивы глаз кроликов не наблюдалось, что указывает на отсутствие местного раздражающего действия Ніб-вакцины.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментальных доклинических исследований на животных при однократном и многократном внутримышечном введении лиофилизированной Ніб-вакцины, полученной на основе синтетического полисахарида, конъюгированного со столбнячным анатоксином, не было обнаружено симптомов интоксикации, что свидетельствовало об отсутствии токсического действия вакцины. Лيوфилизированная Ніб-вакцина по результатам всех проведенных исследований соответствовала требованиям, предъявляемым к препаратам такого класса, и на этом основании была использована для дальнейшего изучения в качестве одного из компонентов комбинированных вакцин⁷.

⁷ Материал опубликован в статье: Белякова, О.В. Разработка и стандартизация лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа b / О.В. Белякова, А.М. Николаева, О.Ю. Соснина, О.С. Дрожжачих // Пермский медицинский журнал. – 2014. – Т.2, №31. – С. 102–108.

ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВКЛЮЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО НІВ-КОМПОНЕНТА В СОСТАВ КОМБИНИРОВАННЫХ ВАКЦИН

Комбинированные вакцины представляют собой препараты, состоящие из двух или более различных антигенов, физически скомбинированных в одной лекарственной форме. Трудности создания сложной вакцины связаны, прежде всего, с решением проблем совместимости ее компонентов, стабильности и сохранения достаточной иммуногенности препарата [144, 160]. Иммуногенная активность компонентов сложных вакцин может зависеть от многих факторов: способов изготовления компонентов, качественных характеристик адьювантов, консервантов, стабилизаторов. Химическое или физическое взаимодействие между компонентами вакцины может привести к нарушению иммунного ответа на них. В частности, в отношении НіВ-компонента, в опубликованных работах имеются данные, как по интерференции [82, 145, 166], так и по потенцированию [100, 119, 120, 123] иммунного ответа на НіВ-компонент в составе комбинированных вакцин [19].

Поэтому при создании новых комбинированных вакцинных препаратов важно быть уверенным, что включение новых антигенов в состав существующих комбинированных вакцин не снижает безопасность, эффективность и иммуногенность каждого из антигенов, входящих в состав вакцины.

В связи с этим представлялось целесообразным изучить совместимость и конкурентность компонентов (дифтерийного, столбнячного, коклюшного, гепатитного и гемофильного) в составе двух вариантов вакцин: АКДС-ГепВ+НіВ с цельноклеточным коклюшным компонентом, аАКДС-ГепВ+НіВ с бесклеточным коклюшным компонентом (табл. 63).

Состав исследуемых комбинированных вакцин

Варианты комбинированных вакцин	Содержание в одной прививочной дозе (0,5 мл)						
	Дифтерийный анатоксин, Lf	Столбнячный анатоксин, Lf	НВsAg, мкг	Коклюшные микробные клетки, млрд	Бесклеточный коклюшный компонент, мкг	Ніb, мкг	Инактивированные вирусы полиомиелита
АКДС-ГепВ*	15	5	5	10	-	-	-
Пентаксим®*	30	10	-	-	Коклюшный анатоксин – 25; филаментозный гемагглютинин - 25	10	тип 1 – 40 ед. D-антигена тип 2 – 8 ед. D-антигена тип 3 – 32 ед. D-антигена
аАКДС-ГепВ	20	5	5	-	60	-	-
АКДС-ГепВ+Ніb	15	5	5	10	-	10	-
аАКДС-ГепВ+Ніb	20	5	5	-	60	10	-
Ніb-вакцина	-	-	-	-	-	10	-

Примечание: *Коммерческие вакцины АКДС-ГепВ и Пентаксим® использовали в качестве препаратов сравнения.

В опытах на животных было установлено, что иммунизация экспериментальными сериями комбинированных вакцин приводила к формированию напряженного иммунитета в отношении всех компонентов, (табл. 64). Не было отмечено достоверных отличий уровня антител (дифтерийных, столбнячных, коклюшных, анти-НВs, гемофильных), индуцируемых различными вариантами сравниваемых комбинаций ($p > 0,05$). Особо следует отметить, что в отличие от зарубежного препарата Пентаксим®, разработанная пятивалентная вакцина аАКДС-ГепВ+Ніb содержит в своем составе в 2 раза меньше столбнячного и дифтерийного антигенов, сохраняя при этом иммунологическую активность в отношении данных антигенов на уровне препарата сравнения. Кроме того, совместное применение АКДС-Геп В вакцины (как с цельноклеточным, так и с бесклеточным коклюшным компонентом) и Ніb-вакцины заметно усиливало иммуногенность Ніb-компонента по сравнению с монопрепаратом ($p < 0,05$). При этом уровень антител к гемофильному компоненту, индуцируемый синтетической лиофилизированной Ніb-вакциной, достоверно не отличался от индуцируемого вакциной Пентаксим®, содержащей капсульный полисахарид. В ходе исследования не было выявлено иммунологической интерференции в отношении какого-либо из антигенов, входящих в состав комбинированных вакцин АКДС-Геп В+Ніb и аАКДС-Геп В+Ніb.

Таблица 64

Иммунный ответ на компоненты комбинированных вакцин
АКДС-ГепВ+Ніb и аАКДС-ГепВ+Ніb в опытах на кроликах
(средняя геометрическая титра)

Препарат	Определяемые антитела (средняя геометрическая титра, доверительный интервал)				
	Дифтерийные, МЕ/мл	Столбнячные, МЕ/мл	Коклюшные, ИЕ/мл*	Анти-НВs, мМЕ/мл	Гемофильные, мкг/мл
АКДС- ГепВ+Ніb	7,700 [3,395-17,462]	13,202 [9,750- 17,876]	1562,607 [501,305- 4870,766]	520,100 [35,685- 7576,012]	58,110 [29,305- 115,189]
аАКДС- ГепВ+Ніb	14,083 [10,456- 18,968]	13,016 [6,754- 25,083]	1142,328 [728,709- 1790,720]	687,700 [218,055- 2168,884]	40,342 [15,064- 108,038]

Препарат	Определяемые антитела (средняя геометрическая титра, доверительный интервал)				
	Дифтерийные, МЕ/мл	Столбнячные, МЕ/мл	Коклюшные, ИЕ/мл*	Анти-НВs, мМЕ/мл	Гемофильные, мкг/мл
АКДС-ГепВ	8,746 [4,334-18,315]	11,312 [9,443-12,023]	1207,540 [177,487-8111,215]	794,014 [74,221-8348,616]	-
Пентаксим®	9,594 [5,828-15,791]	14,321 [9,592-21,382]	142,562 [44,624-455,449]	-	30,874 [13,738-69,385]
Ніb-вакцина (лиофилизат)	-	0,115 [0,078-0,169]	-	-	12,434 [4,796-32,232]

Примечание:

* иммуноферментные единицы

Таким образом, в результате проведенных исследований была экспериментально обоснована возможность получения комбинированных препаратов для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и Ніb-инфекции.

На базе Пермского НПО «Биомед» получены экспериментально-производственные серии комбинированных вакцин против дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и Ніb-инфекции – пятикомпонентные вакцины АКДС-ГепВ+Ніb и аАКДС-ГепВ+Ніb в следующей лекарственной форме: суспензия для внутримышечного введения в комплекте с лиофилизатом для приготовления суспензии для внутримышечного введения.

Для сведения вакцины в одну лекарственную форму к содержимому ампулы с Ніb компонентом (лиофилизату) добавляют при помощи шприца содержимое ампулы с суспензией АКДС-Геп В или аАКДС-Геп В, полученную смесь встряхивают (рис. 21). После полного восстановления лиофилизата препарат представляет собой гомогенную суспензию белого цвета.

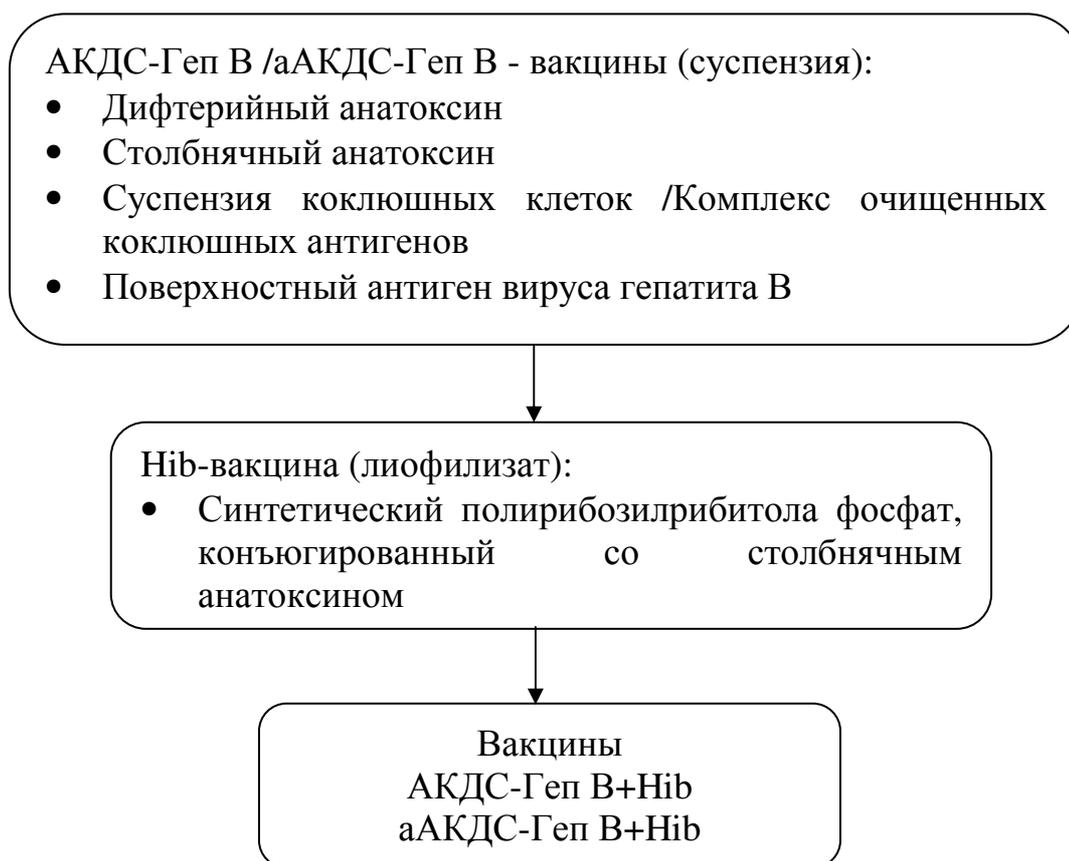


Рис. 21. Схема сведения компонентов комбинированных вакцин

В производственных условиях по разработанной технологии изготовлены экспериментально-производственные серии комбинированных вакцин АКДС-ГепВ+Ніb и аАКДС-ГепВ+Ніb (по три серии каждой вакцины) (акты внедрения от 21.03.2018 и 28.03.2018).

Изучение физико-химических свойств (рН, содержание формальдегида, полнота сорбции, содержание алюминия гидроксида), специфической активности, стерильности, токсичности, специфической безопасности, подлинности показало, что комбинированные вакцины для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и Ніb-инфекции полностью соответствуют требованиям, предъявляемым отечественными и международными нормативными документами к препаратам такого класса (табл. 65 и 66).

Проведенные исследования послужили основанием для разработки технологии изготовления вакцин АКДС-ГепВ+Ніb и аАКДС-ГепВ+Ніb:

проектов Нормативной Документации и Опытно-промышленных регламентов.

Вакцины АКДС-ГепВ+Ніb и аАКДС-ГепВ+Ніb прошли клинические испытания, которые показали их хорошую переносимость, высокий профиль безопасности и выраженную иммуногенность. Выполненные исследования позволили рекомендовать комбинированные вакцины АКДС-ГепВ+Ніb и аАКДС-ГепВ+Ніb для массового применения в рамках Национального календаря профилактических прививок в качестве базового препарата для иммунизации детей [16, 39, 47, 51]⁸.

⁸ Материалы опубликованы в статьях: Николаева, А.М. Доклинические исследования новой пятикомпонентной вакцины АКДС-Геп В+Ніb / А.М. Николаева, В.П. Петровских, О.Ю. Соснина, О.В. Белякова, Т.В. Вязникова, Т.М. Афанасьева // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. – 2013. – Т.3, №47. – С. 41 – 44; Белякова, О.В. Разработка и стандартизация лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа b / О.В. Белякова, А.М. Николаева, О.Ю. Соснина, О.С. Дрожжачих // Пермский медицинский журнал. – 2014. – Т.2, №31. – С. 102–108; Фельдблум, И.В. Результаты многоцентрового клинического исследования новой комбинированной вакцины АКДС-ГепВ+Ніb производства НПО «Микроген» при иммунизации детей 6 месяцев / И.В. Фельдблум, В.В. Романенко, А.М. Николаева, К.А. Субботина, О.Ю. Соснина, О.А. Перминова, О.В. Белякова, Т.В. Данилина, А.Е. Ершов, Д.М. Трофимов, Е.А. Быкова, С.В. Мартиросян, А.В. Анкудинова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. - №2. – С. 68-75.

Результаты контроля вакцины АКДС-ГепВ+Ниб¹

Показатели	Нормы	АКДС-ГепВ+Ниб с.П1	АКДС-ГепВ+Ниб с.П2	АКДС-ГепВ+Ниб с.П3
1	2	3	4	5
рН	От 6,4 до 7,4	7,15	7,05	7,01
Потеря в массе при высушивании - Ниб компонент	Не более 3 %	1,41%	1,50%	2,10%
Специфическая активность	<p>Должен обладать иммуногенной активностью и содержать в 1 мл препарата:</p> <p>не менее 60 международных единиц (МЕ) дифтерийного анатоксина;</p> <p>не менее 80 МЕ столбнячного анатоксина;</p> <p>не менее 8 МЕ коклюшного компонента.</p> <p>Отношение дозы иммуногенной активности стандартного образца вакцины гепатита В адсорбированной, вызывающей выработку антител к HBsAg у 50 % мышей (ED50), к ED50 испытуемой вакцины должно быть не менее 0,5 в тесте «in vivo» (относительная потенция).</p> <p>Содержание HBsAg должно быть в пределах ± 15 % от номинальной величины в тесте «in vitro».</p> <p>Содержание полирибозилрибитола фосфата (PRP) должно быть в пределах ± 20 % от номинальной величины.</p>	93,28 МЕ/мл	92,70 МЕ/мл	81,23 МЕ/мл
-дифтерийный компонент		206,18 МЕ/мл	320,60 МЕ/мл	307,70 МЕ/мл
-столбнячный компонент		13,00 МЕ/мл	19,70 МЕ/мл	10,20 МЕ/мл
-коклюшный компонент		1,16	1,01	1,03
-HBsAg		101,00 %	91,00 %	98,50 %
-Ниб компонент	94,00%	102,00%	99,00%	
Содержание свободного полирибозилрибитола фосфата (PRP) Ниб компонент	Не более 20 %	11,00%	10,00%	11,00%

1	2	3	4	5
Содержание конъюгированного столбнячного анатоксина (белок)	От 40 до 62 мкг/мл	52,00 мкг/мл	50,00 мкг/мл	50,00 мкг/мл
Полнота сорбции: -дифтерийный компонент -столбнячный компонент - HBsAg	В 1 мл надосадочной жидкости препарата должно быть: не более 1 Lf дифтерийного анатоксина; не более 0,1 Lf столбнячного анатоксина; не более 20 нг в 1 мл HBsAg.	0,10 Lf/мл 0,05 Lf/мл менее 20 нг/мл	0,12 Lf/мл Отсутствует менее 20 нг/мл	0,03 Lf/мл Отсутствует менее 20 нг/мл
Формальдегид - аАКДС-Геп В компонент	Не более 100 мкг/мл	50,00 мкг/мл	60,00 мкг/мл	60,00 мкг/мл
Алюминия гидроксид - аАКДС-Геп В компонент	От 0,6 до 1,1 мг/мл (в пересчете на алюминий Al ³⁺)	0,91 мг/мл	0,94 мг/мл	0,92 мг/мл

Примечание:

¹По описанию, времени восстановления препарата, подлинности, проходимости через иглу, времени седиментационной устойчивости, механическим включениям, стерильности, пирогенности, аномальной токсичности и специфической безопасности вакцина соответствует требованиям, предъявляемым отечественными и международными документами к препаратам такого класса.

Таблица 66

Результаты контроля вакцины аАКДС-ГепВ+Ниб¹

Показатели	Нормы	аАКДС- ГепВ+Ниб с.П4	аАКДС- ГепВ+Ниб с.П5	аАКДС- ГепВ+Ниб с.П6
1	2	3	4	5
рН	От 6,4 до 7,4	6,80	6,60	6,60
Потеря в массе при высушивании - Ниб компонент	Не более 3 %	1,20%	1,20%	0,60%
Специфическая активность	<p>Должен обладать иммуногенной активностью и содержать в 1 мл препарата:</p> <p>не менее 60 международных единиц (МЕ) дифтерийного анатоксина;</p> <p>не менее 80 МЕ столбнячного анатоксина;</p> <p>Отношение дозы иммуногенной активности стандартного образца специфической активности бесклеточного компонента вакцины против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша, бесклеточной адсорбированной, вызывающего выработку коклюшных антител у 50 % мышей (ED50), к ED50 испытуемой вакцины должно быть не менее 0,5 в тесте «in vivo» (относительная потенция).</p> <p>Отношение дозы иммуногенной активности стандартного образца вакцины гепатита В адсорбированной, вызывающей выработку антител к HBsAg у 50 % мышей (ED50), к ED50 испытуемой вакцины должно быть не менее 0,5 в тесте «in vivo» (относительная потенция).</p> <p>Содержание HBsAg должно быть в пределах ± 15 % от номинальной величины в тесте «in vitro».</p>			
-дифтерийный компонент		65,89 МЕ/мл	75,79 МЕ/мл	70,70 МЕ/мл,
-столбнячный компонент		134,37 МЕ/мл	134,55 МЕ/мл	175,40 МЕ/мл
-коклюшный компонент		0,71	0,67	0,83
-HBsAg		0,83	0,71	0,71
-Ниб компонент	102,00%	99,00%	99,00%	

1	2	3	4	5
	Содержание полирибозилрибитола фосфата (PRP) должно быть в пределах $\pm 20\%$ от номинальной величины.	88,00%	88,00%	90,00%
Содержание свободного полирибозилрибитола фосфата (PRP) Нiв компонент	Не более 20 %	11,00%	11,00%	10,00%
Содержание конъюгированного столбнячного анатоксина (белок) Нiв компонент	От 40 до 62 мкг/мл	52,00 мкг/мл	50,00 мкг/мл	50,00 мкг/мл
Полнота сорбции: -дифтерийный компонент -столбнячный компонент -коклюшный компонент - HBsAg	В 1 мл надосадочной жидкости препарата должно быть: не более 1 Lf дифтерийного анатоксина; не более 0,1 Lf столбнячного анатоксина; не более 1,25 KE вакцины коклюшной бесклеточной очищенной; не более 20 нг в 1 мл HBsAg.	0,13 Lf/мл Отсутствует 0,63 KE/мл ² менее 20 нг/мл	0,13 Lf/мл Отсутствует 0,63 KE/мл менее 20 нг/мл	менее 1 Lf/мл менее 0,10 Lf/мл менее 1,25 KE/мл менее 20 нг/мл
Формальдегид - аАКДС-Геп В компонент	Не более 100 мкг/мл	20,00 мкг/мл	20,00 мкг/мл	30,00 мкг/мл
Алюминия гидроксид - аАКДС-Геп В компонент	От 0,6 до 1,1 мг/мл (в пересчете на алюминий Al ³⁺)	0,94 мг/мл	0,90 мг/мл	1,10 мг/мл

Примечание:

¹По описанию, времени восстановления препарата, подлинности, проходимости через иглу, времени седиментационной устойчивости, механическим включениям, стерильности, пирогенности, аномальной токсичности и специфической безопасности вакцина соответствует требованиям, предъявляемым отечественными и международными документами к препаратам такого класса.

²KE – коклюшные единицы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено соответствие активной фармацевтической субстанции синтетического полирибозилрибитола фосфата, конъюгированного со столбнячным анатоксином, требованиям Европейской Фармакопеи 8 издания по показателям подлинности, распределению по размеру молекул, содержанию примесей, остаточных функциональных групп, белка, общего и свободного PRP, соотношению PRP: белок-носитель, пирогенности и стерильности. Разработана методика определения посторонних примесей в субстанции с применением обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (Пат. №2621645). Проведена валидация методик контроля качества по следующим характеристикам: специфичность, правильность, линейность, диапазон применения, прецизионность.

2. Разработан состав и технология лиофилизированной формы синтетической Нib-вакцины. Технология обеспечивает получение стабильной лекарственной формы препарата: в стресс-испытаниях, в испытаниях методом ускоренного старения и в долгосрочных испытаниях содержание свободного PRP в лиофилизированной Нib-вакцине не превышало 12 % (при норме $\leq 20\%$). Установлен срок годности препарата - 3 года хранения при температуре от 2 до 8 °С.

3. Установлены нормы качества, проведена валидация методик контроля и разработана спецификация на лиофилизированную Нib-вакцину. Установлено соответствие лиофилизированной Нib-вакцины требованиям Европейской Фармакопеи 8 издания по показателям специфической активности, подлинности, пирогенности, стерильности. Установлено, что иммуногенность лиофилизированной синтетической Нib-вакцины достоверно не отличается ($p > 0,05$) от иммуногенности коммерческих вакцин Акт-ХИБ® (Франция) и Хиберикс® (Бельгия), содержащих капсульный полисахарид.

4. Установлено, что лиофилизированная Ніб-вакцина при однократном и многократном внутримышечном введении не вызывала гибели животных, изменения поведения, снижения двигательной активности, снижения аппетита, изменения волосяного покрова, снижения массы тела. По совокупности всех проведенных исследований вакцина может быть отнесена к VI классу относительно безвредных веществ по классификации К.К. Сидорова.

5. Разработаны и экспериментально обоснованы конструкции комбинированных вакцин для иммунизации против дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и Ніб-инфекции - АКДС-ГепВ+Ніб и аАКДС-ГепВ+Ніб в виде лекарственной формы - суспензия для внутримышечного введения в комплекте с лиофилизатом для приготовления суспензии для внутримышечного введения. В ходе исследования не было выявлено иммунологической интерференции в отношении какого-либо из антигенов, входящих в состав комбинированных вакцин АКДС-Геп В+Ніб и аАКДС-Геп В+Ніб.

6. Разработан проект нормативной документации на лиофилизированную Ніб-вакцину, который включен в проекты опытно-промышленных регламентов на вакцины АКДС-ГепВ+Ніб и аАКДС-Геп В+Ніб.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 6 : Использование значений точности на практике. – Введ. 2002–11–01. – Москва, 2002. – 42 с.
2. ГОСТ Р 52249–2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. – Введ 2010–01–01 ; взамен ГОСТ Р 52249–2004. – Москва, 2009. – 211 с.
3. ГОСТ Р 57129–2016 Лекарственные средства для медицинского применения. Ч. 1 : Изучение стабильности новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Общие положения. – Москва : Стандартинформ, 2016. – 16 с.
4. ГОСТ Р 57688–2017 Лекарственные средства для медицинского применения. Изучение стабильности биотехнологических/биологических лекарственных препаратов. – 2018–08. – Москва : Стандартинформ, 2017. – 8 с.
5. ОСТ 34–70–953.19–91. Воды производственных тепловых электростанций. Методы определения ЭДТА и её солей. – Введ. 1992–07–01. – Москва, 1991. – 11 с.
6. ТУ 9388–164–14237183–2012. Тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаггутинации. – Введ. 2012–06–20. – Москва, 2012. – 21 с.
7. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям [Электронный ресурс] : приказ Минздрава России от 21.03.2014 № 125н. – Режим доступа : http://www.rospotrebnadzor.ru/deyatelnost/epidemiologicalsurveillance/?ELEMENT_ID=5575.

8. РД 42–28–8–89. Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. Основные положения. – Москва, 1989. – 31 с.
9. СП 3.3.2.561–96. Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов. – Москва, 1998. – 63 с.
10. МР 3.3.1.0001-10 Эпидемиология и вакцинопрофилактика инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* типа *b*: Методические рекомендации. – Москва : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 32 с.
11. МУ 64–04–001–2002. Производство лекарственных средств. Валидация. Основные положения : (утв. распоряжением М-ва пром-сти, науки и технологий Рос. Федерации. – [Б. м., б. г.]. – 12 с.
12. МУ 4119–86. Методические указания по определению диметилсульфоксида и его метаболита диметилсульфона методом газожидкостной хроматографии в сахарной свекле, картофеле и зеленой массе : (утв. зам. глав. гос. санит. врача СССР 28.05.1986). – Москва, 1988. – 18 с.
13. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств : (утв. приказом М-ва пром-сти и торговли Рос. Федерации 14.06.2013 № 916). – Москва, 2013. – 70 с.
14. Акимова, Ю. И. Комбинированные вакцины на основе АКДС: преимущества, сложности, перспективы // Ю. И. Акимова, М. В. Проценко // Современная организация лекарств. обеспечения. – 2013. – № 3. – С. 15–21.
15. Бахтин, И. А., Совершенствование процесса сублимационного высушивания лекарственных препаратов : дис. ... канд. фармацевт. наук / И. А. Бахтин. – Пермь, 2012. – 123 с.
16. Безопасность и иммуногенность отечественной комбинированной вакцины против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В и Н1в-инфекции, содержащей бесклеточный коклюшный компонент, при иммунизации

взрослых / И. В. Фельдблюм [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 1. – С. 46–51.

17. Безопасность сочетанного введения вакцин против Hib-инфекции : (по данным пилотного проекта, проведенного в Мурманской области и Ярославле) / С. М. Харит [et al.] // Вопр. соврем. педиатрии. – 2009. – Т. 8, № 6. – С. 36–41.

18. Ботвиньева, В. В. Особенности течения гемофильной инфекции типа b у детей / В. В. Ботвиньева, А. Г. Гайворонская // Вопр. диагностики в педиатрии. – 2009. – Т. 1, № 3. – С. 14–19.

19. Вакцина АКДС-ИПВ//PRP~Т : обзор 16-летнего опыта клинич. применения / S. A. Plotkin [et al.] // Вопр. соврем. педиатрии – 2012 – Т. 11, № 1 – С. 18–36.

20. Вакцины и вакцинация: нац. руководство / под ред. В. В. Зверева, Б. Ф. Семенова, Р. М. Хаитова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 880 с.

21. Валидация аналитических методик для производителей лекарств : типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств, подготовленное Федер. союзом фармпроизводителей Германии (ВАН) / пер. Ж. И. Аладышевой, О. Р. Спицкого ; под ред. В. В. Береговых. – Москва : Литтерра, 2008. – 132 с.

22. Всемирная организация здравоохранения. Вакцинация против гемофильной инфекции типа b (Hib) [Электронный ресурс] // Еженед. эпидемиол. бюл. – 2013. – Т. 88. – С. 413–428. – Режим доступа : www.who.int/entity/immunization/documents/Hib_Refs_Rus.pdf?ua=1.

23. Гемофильная инфекция типа b. Заболеваемость и вакцинопрофилактика / М. В. Абрамцева [и др.] // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017. – Т. 17, № 2. – С. 78–86.

24. Государственная Фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс] : в 3 т. / Федер. электрон. мед. б-ка. – 13-е изд. – Москва, 2015. – Режим доступа : <http://femb.ru/feml>.

25. Гусаров, Д. А. Лиофилизация биофармацевтических белков : (миниобзор) // Биофармац. журн. – 2010. – Т.2, № 5. – С. 3–7.
26. Доклинические испытания эффективности и безопасности новых иммунобиологических лекарственных препаратов : метод. рекомендации / ФГБУ «ГИСК им. Л. А. Тарасевича» Минздравсоцразвития России. – Москва, 2010. – 39 с.
27. Доклинические исследования новой комбинированной вакцины против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В и гемофильной инфекции типа В, содержащей бесклеточный коклюшный компонент / А. М. Николаева [и др.] // Рос. иммунол. журн. 2014. – Т. 8, № 3. – С. 911–914.
28. Заболеваемость гнойными бактериальными менингитами у детей в возрасте до 5 лет в Москве / А. Е. Платонов [и др.] // Эпидемиология и инфекц. болезни. – 2006. – № 4. – С. 36–43.
29. Инструкция по применению набора реагентов ТН-ДСК-КОА «Тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаггутинации» : утв. 29.05.2012. – Москва, 2012. – 10 с.
30. Калашникова, Е. А. Совершенствование системы обеспечения контроля качества комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша на основе экспрессных методов анализа : дис. ... канд. фармац. наук / Е. А. Калашникова ; Перм. фармац. акад. – Пермь, 2014. – 185 с.
31. Комбинированные вакцины в национальных календарях профилактических прививок для детей в Беларуси, Казахстане, России и Украине / А. А. Баранов [и др.] // Педиатр. фармакология. – 2007. – Т. 4, № 1. – С. 6–18.
32. Крамарь, Л. В. Гемофильная инфекция у детей: проблемы и перспективы / Л. В. Крамарь, Ю. О. Хлынина // Лекарств. вестн. – 2011. – Т. 6, № 3 – С. 43–47.

33. Лиофилизация как способ стабилизации лекарственных препаратов : (обзор) / Л. Л. Николаева [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2017. – Т. 51, № 4. – С. 54–59.
34. Медуницын, Н. В. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней : учеб. пособие / Н. В. Медуницын, В. И. Покровский. – Москва, ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 512 с. : ил.
35. Николаев, М. К. Инфекция, вызываемая *Haemophilus influenzae* серотипа b (Hib), и перспективы её вакцинопрофилактики в России / М. К. Николаев, А. Е. Платонов // Эпидемиология и инфекц. болезни. – 2009. – № 4 – С. 125–133.
36. Николаева, А. М. Конструирование комбинированных вакцин и иммуноферментных тест-систем для профилактики и диагностики управляемых инфекций (дифтерия, столбняк, коклюш, гепатит В) : дис. ... д-ра биол. наук / А. М. Николаева. – Челябинск, 2003. – 254 с.
37. Определение этилендиаминтетрауксусной кислоты в майонезе методом ион-парной обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии / А. М. Захарова [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2014. – Т. 14. – С. 104–110.
38. Осадчая, А. И. Влияние некоторых факторов на криорезистентность и сохранение жизнеспособности при лиофилизации культур *Bacillus subtilis* / А. И. Осадчая, В. А. Кудрявцев, Л. А. Сафронова // Биотехнология. – 2002. – № 3. – С. 45–54.
39. Оценка безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины аАКДС-ГепВ+Hib / В. В. Романенко [и др.] // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 120-летию филиала АО НПО «Микроген» в г. Пермь Пермского Научно-производственного объединения «Биомед». – Пермь, 2018. – С. 116–119.
40. Оценка эффективности вакцинопрофилактики гемофильной инфекции типа b // О. А. Рычкова [и др.] // Педиатр. фармакология. – 2009. – Т. 6. № 6. – С. 41–44.

41. Пат. 5381, ЕАПО МПК А61К 39/102, С07Н 15/04 Олигосахаридные производные рибоза-рибит-фосфата и содержащие их вакцины / Верес Бенкомо Висенте Гильермо, Рой Рене ; заявитель и патентообладатель Универсидад де ла Хабана, Юниверсити оф Оттава. – № 200200314 ; заявл. 15.08.2000 ; опубл. 24.02.2005, бюл. № 1.

42. Пат. 2185191 Рос. Федерация, МПК А61К39/02, А61К39/102, С12Р19/04, С12Р21/00. Способ получения антигенного препарата *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) / Э.А. Яговкин [и др.] ; заявитель Ростов. научн.-исслед. ин-т микробиологии и паразитологии ; патентообладатель Ростов. научн.-исслед. ин-т микробиологии и паразитологии ; Науч.-производств. предприятие «Биомед» – № 2001102923/13 ; заявл. 01.02.2001 ; опубл. 20.07.2002, Бюл. № 20.

43. Пат. 2504399 Рос. Федерация, МПК А61К39/10, А61Р31/00. Способ получения бесклеточной вакцины для иммунопрофилактики коклюша / А. М. Николаева [и др.] ; заявитель и патентообладатель ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России. – № 2012152561/15 ; заявл. 06.12.2012 ; опубл. 20.01.2014, Бюл. № 2.

44. Пат. 2621645 Рос. Федерация, МПК G01N 30/74 (2006.01), G01N 33/15 (2006.01). Способ определения примесей этилендиаминтетрауксусной кислоты, диметилсульфоксида и N-этилмалеимида методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в фармацевтических субстанциях / О.В. Белякова [и др.] ; заявитель и патентообладатель ФГУП НПО «Микроген» Минздрава Рос. Федерации. – № 20161101158 ; заявл. 22.03.2016 ; опубл. 06.06.2017, Бюл. № 16.

45. Получение рекомбинантного белка CRM197 в клетках *E. COLI* / И. В. Духовлинов [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2015 –Т. 5, № 1. – С. 37–44.

46. Проспективное популяционное изучение заболеваемости гнойными менингитами у детей в возрасте до 5 лет в 8 городах России / А. Е.

Платонов [и др.] // Эпидемиология и инфекц. болезни. – 2009. – № 4 – С. 133–143.

47. Результаты многоцентрового клинического исследования новой комбинированной вакцины АКДС-ГепВ+Ніb производства НПО «Микроген» при иммунизации детей 6 месяцев / И. В. Фельдблюм [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – № 2. – С. 68–75.

48. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности : метод. рекомендации. – Москва : Спорт и Культура-2000, 2007. – 192 с.

49. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2 / под ред. А. Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – 536 с.

50. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ Минздрава РФ / под общ. ред. Р.У. Хабриева. – Москва, 2005. – 832 с.

51. Сравнительная оценка безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины АКДС-ГепВ+Ніb и вакцины АКДС-Геп В + вакцины Хиберикс (Hiberix) / В.В. Романенко [и др.] // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 120-летию филиала АО НПО «Микроген» в г. Пермь Пермского Научно-производственного объединения «Биомед». – Пермь, 2018. – С. 114–116.

52. Тельнова, Е. А. О системе контроля качества лекарственных средств / Е. А. Тельнова // Вестн. Росздравнадзора. – 2010. – № 4. – С. 10-16.

53. Федосеенко, М. В. Эпоха конъюгированных вакцин: международный опыт успешного применения / М. В. Федосеенко, М. Г. Галицкая, Л. С. Намазова // Педиатр. фармакология. – 2008. – Т. 5, № 6. – С. 8–14.

54. Фролова, Е. Я. Эпидемиологический мониторинг и профилактика гемофильной инфекции типа b в Российской Федерации / Е. Я. Фролова, Н. В. Филатов // Журн. инфектологии. – 2012. – Т. 4, № 2. – С. 73-83.
55. Шахтагинская, Ф. Ч. Преимущество применения комбинированных вакцин у детей / Ф. Ч. Шахтагинская // Практика педиатра. – 2013. – Декабрь. – С. 16–22.
56. Эффективность и безопасность вакцинации против инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* типа b, у детей раннего возраста / В. В. Ботвиньева [и др.] // Педиатр. фармакология. – 2008. – Т. 5, № 4. – С. 54–56.
57. A review of *Haemophilus influenzae* disease in Europe from 2000–2014: challenges, successes and the contribution of hexavalent combination vaccines / S. Wang [et al.] // Expert review of vaccines. – 2017. – Vol. 16, № 11. – P. 1095–1105.
58. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b / V. Verez-Bencomo [et al.] // Science. – 2004. – Vol. 305. – P. 522–525.
59. A Validated Reverse Phase HPLC Method for the Determination of Disodium EDTA in Meropenem Drug Substance with UV-Detection using Precolumn Derivatization Technique / N. Bhavil [et al.] // Anal. Chem. Insights. – 2011. – Vol. 6. – P. 7–14.
60. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. – Geneva, 1997. – 211 p.
61. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides // D. E. Shafer [et al.] // Vaccine. – 2000. – Vol.18. – P. 1273–1281.
62. Adams, G.D. Lyophilization of Vaccines Current Trends / G.D. Adams // Vaccine protocols / ed. A. Robinson, M. J. Hudson, P. Martin. – Second Edition. – Totowa, USA, 2003. – P. 223–243.

63. Analytical Procedures Used in the Control of Bacterial Glycoconjugate Vaccines / X. Lemercinier [et al.] // *Pharmaceutical Sciences*. – 1997. – № 3. – P. 19–23.

64. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic oligosaccharide-protein conjugate vaccine against *Haemophilus influenzae* type b / V. Fernández-Santana [et al.] // *Infect. Immun.* – 2004. – Vol. 72. – P. 7115–7123.

65. Approaches to new vaccines / B. P. Mahon [et al.] // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 18. – P. 257–282.

66. Astronomo, D. R. Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? / D. R. Astronomo, D. R. Burton // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2010. – Vol. 9, № (4). – P. 308–324.

67. Aubin, Y. Using NMR spectroscopy to obtain the higher order structure of biopharmaceutical products / Y. Aubin, C. Jones, D I. Freedberg // *BioPharm. Int (Supplement)*. – 2010. – Vol. 23, № 8. – P. 28–38.

68. Barbour, M. L. Conjugate vaccines and the carriage of *Haemophilus influenzae* type b / M. L. Barbour // *Emerging Infectious Diseases*. – 1996. – Vol. 62. – P. 176–182.

69. Bernstein, H. H. Immunogenicity and safety of a combined diphtheria, tetanus, 5-component acellular pertussis, inactivated poliomyelitis, *Haemophilus* type b conjugate vaccine when administered concurrently with a pneumococcal conjugate vaccine: a randomized, open-label, phase 3 study / H. H. Bernstein, F. Noriega // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29. – P. 2212–2221.

70. Berti, F. Recent mechanistic insights on glycoconjugate vaccines and future perspectives [Electronic resource] / F. Berti, R. Adamo // *ACS Chemical Biology*. – 2013. – Vol. 8. – P. 1653–1663. – Режим доступа : <http://pubs.acs.org> on July 14, 2013.

71. Beurret, M. Development and technology transfer of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines for developing countries / M. Beurret, A. Hamidi, A. Kreeftenberg // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30. – P. 4897–4906.

72. Blue, J. T. Process Scale-Up and Optimization of Lyophilized Vaccine Products / J. T. Blue, J. R. Sinicola, A. Bhambhani // *Lyophilized Biologics and Vaccines* / Ed. D. Varshney, M. Singh. – New York, 2015. – P. 179–210.
73. Bucur, B. Developing a successful lyophilization program requires equal parts design, technology, and expertise / B. Bucur, T. Smith // *Pharma Manufacturing*. – 2009. – Article 36. – P. 1–3.
74. Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates / J. P. Watt [et al.] // *Lancet*. – 2009. – Vol. 374. – P. 903–911.
75. Cavallari, M. From immunologically archaic to neoteric glycovaccines [Electronic resource] / M. Cavallari, G. De Libero // *Vaccines (Basel)*. – 2017. – Vol. 5, № 1. – Режим доступа : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5371740/>.
76. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods [Electronic resource]. – 1994. – Режим доступа : <http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/1-6-13.PDF>.
77. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and Control of *Haemophilus influenzae* Type b Disease [Electronic resource] // *MMWR*. – 2014. – Vol. 63, № 1. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr6301.pdf>.
78. Chandran, A. *Haemophilus influenzae* vaccines / A. Chandran, J. P. Watt, M. Santosham // *Vaccines* / ed. S. A. Plotkin, W. Orenstein, P. A. Offit. – 6th edition. – USA, 2013. – P 167–182.
79. Chang, B. S. *Lyophilized Biologics* / B. S. Chang, M. Reilly, H. Chang // *Lyophilized Biologics and Vaccines* / ed. D. Varshney, M. Singh. – New York, 2015. – P. 93–119.
80. Cintra, F. O. Study of the chemical stability of the capsular polysaccharide produced by *Haemophilus influenzae* type b / F. O. Cintra, M. Takagi // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – Vol. 116. – P. 167–172.
81. Combination Vaccines / D. Skibinski [et al.] // *J. Glob. Infect. Dis.* – 2011 – № 3 (1). – P. 63–72.

82. Combined vaccination of *Haemophilus influenzae* type b conjugate and diphtheria-tetanus-pertussis containing acellular pertussis / J. Eskola [et al.] // *Lancet*. – 1999. – Vol. 354. – P. 2063–2068.
83. Concomitant administration of a bivalent *Haemophilus influenzae* type b-hepatitis B vaccine, measles-mumps-rubella vaccine and varicella vaccine: safety, tolerability and immunogenicity / T. M. Hesley [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2004. – Vol. 23. – P. 240–245.
84. Cox, C. S. Roles of Maillard Reactions in Disease / C. S. Cox. – London : HMSO Publications, 1991. – 97 p.
85. Dagan, R. Combination vaccines containing DTPa-Hib: Impact of IPV and coadministration of CRM197 conjugates / R. Dagan, J. T. Poolman, F. Zepp // *Expert. Rev. Vaccines*. – 2008. – Vol. 7, № 1. – P. 97–115.
86. Decker, M. D. Combination vaccines / M. D. Decker, K. M. Edwards, H. H. Bogaerts // *Vaccines* / ed. S. A Plotkin, W. A. Orenstein, P. A. Offit. – 6th ed. – USA, 2013. – P. 1069–1101.
87. Decker, M. D. Principles of pediatric combination vaccines and practical issues related to use in clinical practice / M. D. Decker // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2001. – Vol. 20. – P. 10–18.
88. Determination of dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone in urine by gas chromatography-mass spectrometry after preparation using 2,2-dimethoxypropane / A. Takeuchi [et al.] // *Biomed Chromatogr.* – 2010. – Vol. 24 (5). – P. 465–471.
89. Determination of EDTA in dairy wastewater and adjacent surface water / Z. X. Congmin [et al.] // *International Journal of Civil and Environmental Engineering*. – 2010. – Vol. 2, № 1. – P. 44–48.
90. Determination of EDTA species in water by square-wave voltammetry using a chitosan-coated glassy carbon electrode / C. Zhao [et al.] // *Water Research*. – 2003. – Vol. 37. – P. 4270–4274.
91. Determination of organic acids in white wines by RP-HPLC / M. Kordis-Krapez [et al.] // *Food Technol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 39. – P. 93–99.

92. Development and validation of a method for the determination of EDTA in non-alcoholic drinks by HPLC / C. E. Cagnasso [et al.] // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2007. – Vol. 20. – P. 248–251.
93. Development and validation of high-performance size exclusion chromatography methods to determine molecular size parameters of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharides and conjugates / J. Thiebaud [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 2014. – Vol. 453. – P. 22–28.
94. Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges and possibilities / J. P. Amorij [et al.] // *Pharm. Res.* – 2008. – Vol. 25, № 6. – P. 1256–1273.
95. Development of Thermostable Lyophilized Inactivated Polio Vaccine / H. Kraan [et al.] // *Pharm. Res.* – 2014/ – Vol. 31. – P. 2618–2629.
96. Differential susceptibility of invasive *Haemophilus influenzae* serotype a and serotype b to ampicillin and other commonly prescribed antibiotics / M. Shuel [et al.] // *Letters in Applied Microbiology*. – 2014. – Vol. 59. – P. 193–199.
97. Economic evaluation of *Haemophilus influenzae* type b vaccination in Moscow, Russian Federation / A. E. Platonov [et al.] // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24. – P. 2367–2376.
98. Effectiveness of hexavalent vaccines against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease: Germany's experience after 5 years of licensure / H. Kalies [et al.] // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – P. 2545–2552.
99. *European Pharmacopoeia 8.0* : Council of Europe. Vol. 1. – Strasbourg, 2014. – 1380 p.
100. Evaluation of a diphtheria–tetanus–acellular pertussis-inactivated poliovirus- *Haemophilus influenzae* type b vaccine given concurrently with meningococcal group C conjugate vaccine at 2, 3 and 4 months of age / N. R. E. Kitchin [et al.] // *Arch. Dis. Child.* – 2007. – Vol. 92. – P. 11–16.

101. Evaluation of the saccharide content and stability of the first WHO International Standard for *Haemophilus influenzae* b capsular polysaccharide / F. Mawas [et al.] // *Biologicals*. – 2007. – Vol. 35. – P. 235–245.
102. Fanget, B. A Varicella vaccine stable at 5 degrees C / B. Fanget, A. Francon // *Dev. Biol. Stand.* – 1996. – Vol. 87. – P. 167–171.
103. Finn, A. Bacterial polysaccharide–protein conjugate vaccines / Adam Finn // *British Medical Bulletin*. – 2004. – Vol. 70. – P. 1–14.
104. Frasch, C. E. *Haemophilus influenzae* Type b Conjugate and Combination Vaccines / C. E. Frasch // *Clin. Immunother.* – 1995. – Vol. 4, № 5. – P. 376–386.
105. Frasch, C. E. Preparation of bacterial polysaccharide–protein conjugates: Analytical and manufacturing challenges / C. E. Frasch // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27. – P. 6468–6470.
106. Gaal, F. F. Determination of EDTA by catalytic amperometric and catalytic potentiometric titration at a small constant current / F. F. Gaal, B. F. Abramovich // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 1977. – Vol. 286, № 3. – P. 222.
107. Gheorghiu, M. Stabilisation of BCG vaccines / M. Gheorghiu, M. Lagranderie, A. M. Balazuc // *Dev. Biol. Stand.* – 1996. – Vol. 87. – P. 251–261.
108. Glycoconjugate Vaccines / N. Ravenscroft [et al.] // *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control* / B. K. Nunnally [et al.] – Chapter 8. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015. – P. 301–380.
109. Granoff, D. M. Assessing Efficacy of *Haemophilus influenzae* Type b Combination Vaccines // *Clinical Infectious Diseases*. – 2001. – Vol. 33. – P. 278–287.
110. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation [Electronic resource] – 14 p. – Режим доступа : <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM386366.pdf>.

111. Haemophilus influenza type b conjugate vaccine stability: catalytic depolymerization of PRP in the presence of aluminium hydroxide / A.W. Sturgess [et al.] // *Vaccine*. – 1999. – Vol. 17. – 1169–1178.

112. Haemophilus influenzae type b (Hib) meningitis in the pre-vaccine era: a global review of incidence, age distribution, and case-fatality rates [Electronic resource] : document WHO/V&B/02.18 / J. V. Bennett [et al.]. – Geneva : World Health Organization, 2002. – P. 1–92. – Режим доступа : www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF02/www696.pdf.

113. Hallström, T. Haemophilus influenzae and the complement system / T. Hallström, K. Riesbeck // *Trends in Microbiology*. – 2010. - Vol. 18, № 6. – P. 258–265.

114. Hermanson, G. T. Bioconjugate techniques / G. T. Hermanson. – Third edition. – UK : Academic Press, 2013. – 1200 p.

115. Hunolstein, C., von. A routine high-performance size-exclusion chromatography to determine molecular size distribution of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines / C. von Hunolstein, L. Parisi, S. Recchia // *Vaccine*. – 1999. – Vol. 17, № 2. – P. 118–125.

116. ICH Topic Q1A R2 Stability Testing of New Drug Substances and Products [Electronic resource]. – Режим доступа : http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf.

117. ICH Topic Q5C Stability testing of biotechnological/biological products [Electronic resource]. – Режим доступа : http://www.ich.org/fileadmin/PublicWeb_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5C/Step4/Q5C_Guideline.pdf.

118. Immunogenicity and reactogenicity of a Haemophilus influenzae type b tetanus conjugate vaccine when administered separately or mixed with concomitant diphtheria-tetanus-toxoid and acellular pertussis vaccine for primary and for booster immunizations / H. J. Schmitt [et al.] // *Eur. J. Pediatr.* – 1998. – Vol. 157. – P. 208–214.

119. Immunogenicity and reactogenicity of primary immunization with a hexavalent diphtheria–tetanus–acellular pertussis–hepatitis B-inactivated polio-Haemophilus influenzae type B vaccine coadministered with two doses of a meningococcal C-tetanus toxoid conjugate vaccine / J. C. Tejedor [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2006. – Vol. 25. – P. 713–720.

120. Immunogenicity and reactogenicity of primary immunization with a novel combined Haemophilus influenzae Type b and Neisseria meningitides Serogroup C-tetanus toxoid conjugate vaccine coadministered with a diphtheria–tetanus–acellular Pertussis–hepatitis B-inactivated poliovirus vaccine at 2, 4 and 6 months / J. C. Tejedor [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2007. – Vol. 26. – P. 1–7.

121. Immunogenicity and safety in infants of a DTwPHib full liquid vaccine / F. I. Botet Asensi [et al.] // *Acta Pediatr.* – 2003. – Vol. 92. – P. 541–545.

122. Immunogenicity and safety of primary and booster vaccination with 2 investigational formulations of diphtheria, tetanus and Haemophilus influenzae type b antigens in a hexavalent DTPa-HBV-IPV/Hib combination– vaccine in comparison with the licensed Infanrix hexa / T. Vesikariy [et al.] // *Human vaccines & immunotherapeutics.* – 2017. – Vol. 13, № 7. – P. 1505–1515.

123. Immunogenicity of one, two or three doses of a meningococcal C conjugate vaccine conjugated to tetanus toxoid, given as a three-dose primary vaccination course in UK infants at 2, 3 and 4 months of age with acellular pertussis-containing DTP/Hib vaccine / J. Southern [et al.] // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24. – P. 215–219.

124. Innovative Vaccine Production Technologies: The Evolution and Value of Vaccine Production Technologies / KyungDong Bae [et al.] // *Archives of Pharmaceutical research.* – 2009. – Vol. 32, № 4. – P. 465–480.

125. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Guidelines. Impurities: Guideline for residual solvents Q3C(R6) 2016 [Electronic resource]. – Режим доступа :

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Q3C__R6__Step_4.pdf.

126. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline Impurities in new drug substances Q3A(R2) 2006 [Electronic resource]. – Режим доступа : http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2__Guideline.pdf.

127. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). [Electronic resource]. – Режим доступа : http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.

128. Introduction of Hib vaccine into national immunization programmes: A descriptive analysis of global trends Isabelle / A. Rossi [et al.] // Vaccine. – 2007. – Vol. 25. – P. 7075–7080.

129. Isolation and purification of capsular polysaccharide of Haemophilus influenzae type b (Hib) by hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) precipitation and chromatography [Electronic resource] / A. Riza, N. Nurainy – Режим доступа : https://www.researchgate.net/publication/268203586_Isolation_and_purification_of_capsular_polysaccharide_of_Haemophilus_influenzae_type_b_Hib_by_hexadecyltrimethylammonium_bromide_CTAB_precipitation_and_chromatography.

130. Jagannath, M. Extraction and purification of capsular polysaccharide from streptococcus pneumoniae and Escherichia coli for conjugate vaccines preparation : Thesis submitted in partial fulfillment for the requirement of the degree of Master of Technology By Department of Biotechnology and Medical Engineering National Institute of Technology : 769008 (ORISSA) / M. Jagannath. – Rourkela, 2009.

131. Jansen, K. U. The role of vaccines in fighting antimicrobial resistance (AMR) [Electronic resource] / K. U. Jansen, A. S. Anderson // *Human Vaccines Immunotherapeutics*. – 2018. – Vol. 0, № 0. – Режим доступа : <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1476814>).
132. Jennings, T. A. Lyophilization. In: *Introduction and basic principles* / T. A. Jennings. – Boca Raton, Florida : CRC Press, 2002. – 646 p.
133. Jones, C. NMR assays for carbohydrate-based vaccines / C. Jones // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2005. – Vol. 38. – P. 840–850.
134. Jones, C. Vaccine based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria / Jones C. // *Annals of the Brazilian Academy of Science*. – 2005. – Vol. 77, № 2. – P. 293–324.
135. Josefsberg, J. O. Vaccine Process Technology / J. O. Josefsberg, B. Buckland // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2012. – Vol. 109, № 6. – P. 1143-1460.
136. Jumel, K. Evaluation of meningococcal C oligosaccharide conjugate vaccines by size-exclusion chromatography/multi-angle laser light scattering / K. Jumel, M. M. Ho, B. Bolgiano // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2002. – Vol. 36. – P. 219–226.
137. Katata, L. Determination of ethylenediaminetetraacetic acid, ethylenediaminedisuccinic acid and iminodisuccinic acid in cosmetic products by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography / L. Katata, V. Nagaraju, A. M. Crouch // *Analytica Chimica Acta*. – 2006. – Vol. 579. – P. 177–184.
138. Kelly, D. F. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines / D. F. Kelly, E. R. Moxon, A. J. Pollard // *Immunology*. – 2004. – Vol. 113. – P. 163–174.
139. Kniskern, P. J. Ellis Haemophilus injluenzae Type b Conjugate Vaccines / P. J. Kniskern, S. Marburg, R. W. Ellis // *Vaccine Design: The Subunit*

and Adjuvant Approach / ed. : F. M. Powell, M. J. Newman. – New York, 1995. – P. 673–718.

140. Koch, R. Bericht uber die Thatigkeit der deutschen Cholera-kommission in Aegyptten and Ostindien / R. Koch // Wien Med. Wochenschr. – 1883. – Vol. 53 – P. 1548–1551.

141. Kram, T. C. Determination of DMSO in Solutions and Ointments by NMR / T. C. Kram, J. W. Turczan // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1967. – Vol. 57, № 4. – P. 651–652.

142. Kvasnicka, F. Determination of EDTA in Mayonnaise by On-Line Coupled Capillary Isotachopheresis–Capillary Zone Electrophoresis with UV Detection / F. Kvasnicka, K. Mikova // J. of Food Composition and Analysis. – 1996. – Vol. 9, № 3. – P. 231–242.

143. Ladhani, S. N. Two Decades of Experience With the Haemophilus influenza Serotype b Conjugate Vaccine in the United Kingdom // Clinical Therapeutics. – 2012. – Vol. 34, Issue 2. – P. 385–399.

144. Lyophilization and the Thermostability of Vaccines / J. Rexroad [et al.] // Cell Preservation Technology. – 2002. – Vol. 1, № 2. – P. 91–104.

145. Magnitude of interference after diphtheriatetanus toxoids-acellular pertussis. Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide-tetanus vaccination is related to the number of doses administered / R. S. Daum [et al.] // J. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 184. – P. 1293.

146. McCormack, P. L. DTaP-IPV-Hep B-Hib Vaccine (Hexaxim®) A Review of its Use in Primary and Booster Vaccination / P. L. McCormack // Pediatric Drugs. – 2013. – Vol. 15, Issue 1. – P. 59–70.

147. Molecular size characterization of bacterial capsular polysaccharide vaccines by high performance liquid chromatography / B. Bussat // Biologicals. – 1990. – Vol. 18. – P. 117–121.

148. Moxon, E. R. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors / E. R. Moxon, J. S. Kroll // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 1990. – Vol. 150. – P. 65–85.

149. Moxon, E. R. The type b capsular polysaccharide as a virulence determinant of *Haemophilus influenzae*: studies using clinical isolates and laboratory transformants / E. R. Moxon, K. A. Vaughn // *J. Infect. Dis.* – 1981. – Vol. 143. – P. 517–524.
150. New perspectives for hexavalent vaccines / P. Obando-Pacheco [et al.] // *Vaccine.* – 2017. – P. 10.
151. Parisi, L. Determination of the molecular size distribution of *Haemophilus influenzae* type b–tetanus toxoid conjugate vaccines by size exclusion chromatography // L. Parisi, C. von Hunolstein // *Journal of Chromatography A.* – 1999. – Vol. 847, № 1–2. – P. 209–211.
152. Peltola, H. *Haemophilus influenzae* type b disease and vaccination in Europe: lessons learned / H. Peltola // *Pediatric. Infect. Dis. J.* – 1998. – Vol. 17. – P. 126–132.
153. Peltola, H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates / H. Peltola // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2000. – Vol. 13, № 2. – P. 302–317.
154. Pfeiffer, R. Die Aetiologie der Influenzaa / R. Pfeiffer // *Z. Hyg Infect.* – 1893. – Vol. 13. – P. 357–386.
155. Pichichero M.E. Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials // *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* – 2013. – Vol. 9, № 12. – P. 2505–2523.
156. Plumb, J. E. Molecular size characterization of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate vaccines / J. E. Plumb, S. E. Yost // *Vaccine.* – 1996. – Vol. 14, № 5. – P. 399–404.
157. Polysaccharide vaccines of group A *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* type b: a field trial in Finland / P. H. Mäkelä [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 1977. – Vol. 136 (Suppl.). – P. 43–50.

158. Preparation, characterization, and immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-protein conjugates / R. Schneerson [et al.] // J. Exp. Med. – 1980. – Vol. 152. – P. 361–376.

159. Prevention of Hemophilus influenzae type b bacteremic infections with the capsular polysaccharide vaccine / H. Peltola [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1984. – Vol. 310. – P. 1561–1566.

160. Primary vaccination of infants with diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B virus-inactivated polio virus and Haemophilus influenzae type b vaccines given as either separate or mixed injections / H. J. Schmitt [et al.] // J. Pediatr. – 2000. – Vol. 137. – P. 304–312.

161. Production of glycoprotein vaccines in Escherichia coli [Electronic resource] / J. Ihssen [et al.] // Microbial Cell Factories. – 2010. – Режим доступа : https://www.researchgate.net/publication/45628678_Production_of_glycoprotein_vaccines_in_Escherichia_coli.

162. Quantitative nuclear magnetic resonance analysis and characterization of the derivatized Haemophilus influenza type b polysaccharide intermediate for PedvaxHIB / Q. Xu [et al.] // Analytical Biochemistry. – 2005. – Vol. 337. – P. 235–245.

163. Reduction of oropharyngeal carriage of Haemophilus influenzae type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine / A. K. Takala [et al.] – J. Infect. Dis. – 1991. – Vol. 164. – P. 982–986.

164. Relationships among physico-chemical and biological tests for a synthetic Hib–TT conjugate vaccine / M. L. C. Cuervo [et al.] // Vaccine. – 2007. – Vol. 25. – P. 194–200.

165. Responses of children immunized with the capsular polysaccharide of Hemophilus influenzae, type b / D. H. Smith [et al.] // Pediatrics. – 1973. – Vol. 52. – P. 637–644.

166. Risk of vaccine failure after Haemophilus influenzae type b (Hib) combination vaccines with acellular pertussis / J. McVernon [et al.] // Lancet. – 2003. – Vol. 361. – P. 1521.

167. Roberts, M. Comparative virulence of *Haemophilus influenzae* with a type b or type d capsule / M. Roberts, T. L. Stull, A. L. Smith // *Infect. Immun.* – 1981. – Vol. 32. – P. 518–524.
168. Safety and immunogenicity of concurrent administration of measles-mumps-rubella-varicella vaccine and PedvaxHIB(R) vaccines in healthy children twelve to eighteen months old / P. D. Reuman [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 1997. – Vol. 16. – P. 662–667.
169. Shinefield, H. R. Overview of the development and current use of CRM197 conjugate vaccines for pediatric use / H. R. Shinefield // *Vaccine.* – 2010. – Vol. 28. – P. 4335–4339.
170. Size determination of bacterial capsular oligosaccharides used to prepare conjugate vaccines / N. Ravenscroft [et al.] // *Vaccine.* – 1999. – Vol. 17. – P. 2802–2816.
171. Stabilisation of Vaccines using Trehalose (Q-T4) / E. M. Gribbon [et al.] // *Technology Dev. Biol. Stand.* – 1996. – Vol. 87. – P. 193–199.
172. Structural studies and chemistry of bacterial capsular polysaccharides. Investigations of phosphodiester-linked capsular polysaccharides isolated from *Haemophilus influenzae* types a, b, c, and f: NMR spectroscopic identification and chemical modification of end groups and the nature of base-catalyzed hydrolytic depolymerization / W. Egan [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1982. – Vol. 104. – P. 2898–2910.
173. Syed, Y.Y. DTaP5-HB-IPV-Hib Vaccine (Vaxelis) : A Review of its Use in Primary and Booster Vaccination / Y.Y. Syed // *Pediatric Drugs.* – 2017. – Vol. 19, Issue 1. – P. 69–80.
174. Tebbutt, G. M. Evaluation of some methods for the laboratory identification of *Haemophilus influenzae* / G. M. Tebbutt // *J. Clin. Pathol.* – 1983. – Vol. 36. – P. 991–995.
175. The clinical and immunologic response of Chilean infants to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide–tetanus protein conjugate vaccine coadministered in the same syringe with diphtheria-tetanus toxoids-pertussis

vaccine at two, four and six months of age / C. Ferreccio [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 1991. – Vol. 10. – P. 764–771.

176. The induction of immunologic memory after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b conjugate and acellular pertussis-containing diphtheria, tetanus, and pertussis vaccine combination / D. Goldblatt [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 1999. – Vol. 180. – P. 538–541.

177. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b [Electronic resource] / H. Käyhty [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 1983. – Vol. 147, № 6. – P. 1100. – Режим доступа : <https://doi.org/10.1093/infdis/147.6.1100>.

178. Thermostable formulations of a hepatitis B vaccine and a meningitis A polysaccharide conjugate vaccine produced by a spray drying method / D. Chen [et al.] // *Vaccine.* – 2010. – Vol. 28. – P. 5093–5099.

179. Tsai, C. M. Quantification of polysaccharide in *Haemophilus influenzae* type b conjugate and polysaccharide vaccines by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection / C. M. Tsai, X. X Gu, R. A. Byrd // *Vaccine.* – 1994. – Vol. 12. – P. 700–706.

180. Thumm, W. Determination and quantification of dimethyl sulfoxide by HPLC / W. Thumm, D. Freitag, A. Kettrup // *Chromatographia.* – 1991. – Vol. 32. – P. 461–462.

181. United States Pharmacopeia 30-NF 25 [Electronic resource]. – Режим доступа : <http://www.twirpx.com/file/165316>.

182. Usonis, V. Does concomitant injection of a combined diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B virus-inactivated polio virus vaccine influence the reactogenicity and immunogenicity of commercial *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines? / V. Usonis, V. Bakasenas // *Eur. J. Pediatr.* – 1999. – Vol. 158. – P. 398–402.

183. Walker, J. T. Quantitation of residual dimethylsulfoxide in a drug substance (Bisnafide) by reversed-phase high-performance liquid chromatography

/ J. T. Walker, D. L. Paolini, J. Segretario // Journal of chromatographic science. – 1996. – Vol. 34. – P. 513–516.

184. Wang, W. Lyophilization and development of solid protein Pharmaceuticals / W. Wang // International Journal of Pharmaceutics. – 2000. – Vol. 203. – P. 1–60.

185. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines [Electronic resource]. – Режим доступа : http://www.who.int/biologicals/publications/nonclinica_evaluation_vaccines_nov_2003.

186. WHO. Haemophilus influenzae type b vaccines (Immunological basis for immunization series ; module 9) [Electronic resource]. – Geneva : World Health Organization, 2007. – Режим доступа : http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241596138_eng.pdf.

187. WHO International Standard. Haemophilus influenzae b polysaccharide Polyribosyl ribitol phosphate (PRP) NIBSC code: 02/208 : instructions for use. –Version 4.0. – UK, 2013. – 2 p.

188. WHO technical report series, No. 897. Annex 1 Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines [Electronic resource]. – 2000. – Режим доступа : http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/WHO_TRS_897_A1.pdf?ua=1.

189. Wasserman A. Lyophilization in vaccine processes / A. Wasserman, R. Sarpal, B. R. Phillips // Vaccine development and manufacturing / ed. E. P. Wen, R. Ellis, N. S. Pujar. – First edition. – Hoboken, USA, 2014. – P. 263–285.

190. World Health Organization. Guidelines on stability evaluation of vaccines [Electronic resource]. – 2006. – Режим доступа : http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/stability/Microsoft%20Word%20-%20BS%202049.Stability.final.09_Nov_06.pdf?ua=1.

191. Zarei, A. E. Hib Vaccines: past, present, and future perspectives [Electronic resource] / A. E. Zarei, H. A. Almehdar, E. M. Redwan // J. Immunol. Res. – 2016. – Режим доступа :

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4745871/pdf/JIR2016-7203587.pdf>.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2621645

**СПОСОБ ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ
ЭТИЛЕНДИАМИНТЕТРАУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ,
ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА И N-ЭТИЛМАЛЕИМИДА В
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЯХ МЕТОДОМ
ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное унитарное предприятие "Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам "Микроген" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2016110158

Приоритет изобретения 22 марта 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 06 июня 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 22 марта 2036 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 621 645** (13) **C1**(51) МПК
G01N 30/74 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2016110158, 22.03.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.03.2016

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.03.2016

(45) Опубликовано: 06.06.2017 Бюл. № 16

Адрес для переписки:

127473, Москва, 2-й Волконский пер., 10,
Федеральное государственное унитарное
предприятие "Научно-производственное
объединение по медицинским
иммунобиологическим препаратам "Микроген"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации

(72) Автор(ы):

Купцов Василий Николаевич (RU),
Ефимова Ирина Сергеевна (RU),
Белякова Ольга Валерьевна (RU),
Иванов Александр Викторович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное унитарное
предприятие "Научно-производственное
объединение по медицинским
иммунобиологическим препаратам
"Микроген" Министерства здравоохранения
Российской Федерации (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: M. Kordis-Krapez et al.Determination of Organic Acids in White
Wines by RP-HPLC / Organic Acids in White
Wines, Food technol. biotechnol, 2001, 39 (2),
pages 93-99. А.М.Захарова и др.Определение этилендиаминтетрауксусной
кислоты в майонезе методом ион-парной
обращенно-фазовой высокоэффективной
жидкостной хроматографии / Сорбционные
и хроматографические процессы, 2014, т.
14, вып. 1, стр. 104-110. P. Laine et al.Simultaneous determination of DTPA, EDTA,
and NTA by UV-visible spectrometry and
HPLC / Anal Bioanal Chem, 2005 Aug; 382
(7), pages 1601-1609 (abstract).(54) СПОСОБ ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ
ЭТИЛЕНДИАМИНТЕТРАУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ, ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА И N-
ЭТИЛМАЛЕИМИДА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЯХ МЕТОДОМ ОБРАЩЕННО-
ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

(57) Формула изобретения

Способ одновременного определения примесей этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), диметилсульфоксида (ДМСО) и N-этилмалеимида (ЭТМ) в фармацевтических субстанциях методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, включающий разделение на хроматографической колонке, заполненной обращенно-фазовым носителем, содержащим привитую фазу C18, использование раствора кислоты ортофосфорной в качестве подвижной фазы, детектирование с использованием спектрофотометрического детектора при длине волны 210 нм, отличающийся тем, что определение ЭДТА, ДМСО и ЭТМ в фармацевтической

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблицы стабильности лиофилизированной Н1b-вакцины

Таблица 54

Результаты стресс-исследования стабильности лиофилизированной Н1b-вакцины с.6

Температура хранения, °С	Срок хранения, сутки	Описание	Подлинность PRP	Подлинность белка-носителя	Осмоляльность, мОсмоль/кг	Растворимость	Содержание PRP, % от номинальной величины	Содержание свободного PRP, %
(50±2)	2	Соотв.	Соотв.	Соотв.	350	Соотв.	99	1
	8	- // -	- // -	- // -	350	- // -	97	3
	12	Не выдерживает	- // -	- // -	352	- // -	99	1
	19	- // -	- // -	- // -	350	- // -	95	5
(60±2)	2	Не выдерживает	Соотв.	Соотв.	352	Соотв.	98	2
	8	- // -	- // -	- // -	351	Не выдерживает	95	5
	12	- // -	- // -	- // -	350	- // -	96	4
	19	- // -	- // -	- // -	354	- // -	96	4

Примечание: Соотв. – соответствует установленным требованиям.

Таблица 55

Результаты исследования стабильности лиофилизированной Нiв-вакцины методом «ускоренного старения»

Серия, №	Срок хранения, сутки	Описание	Подлинность PRP	Подлинность белка-носителя	рН	Осмоляльность, мОсмоль/кг	Растворимость	Потеря в массе при высушивании, %	Стерильность	Аномальная токсичность	Специфическая безопасность	Специфическая активность		Содержание свободного PRP, %
												В тесте «in vivo» должен вызывать выработку антител не менее чем у 50 % животных (кроликов)	Содержание PRP в тесте «in vitro» должно быть в пределах ± 20 % от номинальной величины	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	9	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,12	377	Соотв.	1,40	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	94,00	6,00
	18	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,11	380	Соотв.	1,44	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	93,60	6,40
	27	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,12	380	Соотв.	1,42	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	95,00	5,00
	35	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,10	378	Соотв.	1,40	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	94,00	6,00
	44	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,14	379	Соотв.	1,43	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	95,10	4,90
	53	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,14	380	Соотв.	1,44	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	94,50	5,50
3	9	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,08	370	Соотв.	1,50	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	100,00	0,00
	18	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,10	370	Соотв.	1,50	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	105,00	0,00
	27	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,10	371	Соотв.	1,52	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	100,00	0,00
	35	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,11	370	Соотв.	1,52	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	98,50	1,50
	44	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,10	368	Соотв.	1,50	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	99,20	0,80
	53	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,10	369	Соотв.	1,50	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	97,80	2,20
5	9	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,05	400	Соотв.	2,00	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	88,60	11,40
	18	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,00	401	Соотв.	2,00	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	90,20	10,80
	27	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,00	401	Соотв.	2,20	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	91,80	8,20
	35	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,02	400	Соотв.	2,10	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	91,50	8,50
	44	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,05	402	Соотв.	2,10	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	92,00	8,00

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	53	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,02	400	Соотв.	2,10	Стерилен	Нетоксичен	Безопасен	100%	88,00	12,00

Примечание: Соотв. – соответствует установленным требованиям.

Таблица 56

Результаты долгосрочного исследования стабильности лиофилизированной Нiв-вакцины

Серия, №	Срок хранения, месяц	Описание	Подлинность PRP	Подлинность белка-носителя	рН	Осмоляльность, мОсмоль/кг	Растворимость	Потеря в массе при высушивании, %	Стерильность	Пирогенность	Аномальная токсичность	Специфическая безопасность	Специфическая активность		Содержание свободного PRP, %
													В тесте «in vivo» должен вызывать выработку антител не менее чем у 50 % животных (кроликов)	Содержание PRP в тесте «in vitro» должно быть в пределах ± 20 % от номинальной величины номинальной величины	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	3	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,15	374	Соотв.	1,42	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	94,20	5,80
	6	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,15	375	Соотв.	1,42	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	94,00	6,00
	9	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,15	376	Соотв.	1,44	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	94,50	5,50
	12	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,20	380	Соотв.	1,43	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	94,20	6,80
	18	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,20	372	Соотв.	1,42	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	94,00	6,00
	24	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,20	375	Соотв.	1,40	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	95,00	5,00
	30	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,18	382	Соотв.	1,50	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	94,00	6,00
3	36	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,15	369	Соотв.	1,45	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	94,50	6,50
	3	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,05	374	Соотв.	1,50	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	99,20	0,80
	6	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,05	365	Соотв.	1,50	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	99,00	1,00
	9	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,09	369	Соотв.	1,50	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	99,00	1,00
	12	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,10	370	Соотв.	1,50	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	99,00	1,00
	18	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,01	375	Соотв.	1,50	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	98,50	1,50
	24	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,12	377	Соотв.	1,50	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	98,80	1,00

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	30	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,05	369	Соотв.	1,50	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	100,00	0,00
	36	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,10	370	Соотв.	1,50	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	99,00	1,00
5	3	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,01	401	Соотв.	2,10	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	91,10	8,81
	6	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,01	402	Соотв.	2,10	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	91,00	9,00
	9	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,05	400	Соотв.	2,20	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	92,00	8,00
	12	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,03	402	Соотв.	2,00	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	91,00	9,00
	18	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,03	392	Соотв.	2,00	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	93,50	6,50
	24	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,03	388	Соотв.	2,10	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	90,00	10,00
	30	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,05	390	Соотв.	2,10	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	91,00	9,00
36	Соотв.	Соотв.	Соотв.	7,05	385	Соотв.	2,10	Стерилен	Апирогенен	Нетоксичен	Безопасен	100%	90,50	9,50	

Примечание: Соотв. – соответствует установленным требованиям.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Акты внедрения

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО «Пермская государственная
фармацевтическая академия» Минздрава России,
доцент, к.ф.н.  А.Ю. Турышев
«» 2018 г.

АКТ

внедрения результатов диссертационной работы Беляковой Ольги Валерьевны

на тему «Разработка и использование лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, в составе комбинированных вакцин» в учебный процесс кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии.

Объект внедрения: результаты научных исследований соискателя Беляковой О.В. по разработке технологии получения лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b* и включению ее в состав комбинированных вакцин.

Разработчики: аспирант Белякова О.В., профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Николаева А.М.

Пользователи: слушатели факультета дополнительного профессионального обучения, а также студенты очного и заочного факультетов при подготовке по специальности «Фармация» и «Биотехнология» Пермской государственной фармацевтической академии.

Когда внедрено: сентябрь 2018 года.

Эффективность внедрения: материалы диссертационной работы включены в лекционный материал курса биотехнологии и Дополнительной профессиональной программы повышения квалификации.

Зав. кафедрой промышленной технологии лекарств
с курсом биотехнологии ФГБОУ ВО ПГФА
Минздрава России, профессор, д.ф.н.



Е.В. Орлова

Методист курса биотехнологии
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, к.ф.н.




Ю.В. Сорокина

Подпись:  А.Ю. Турышев
 (подп. от лица автора)  О.В. Белякова

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора по производству
филиала АО «НПО «Микроген»
в г. Пермь

«Пермское НПО «Биомед»,

_____ И.А. Бахтин

« 21 » _____ 2018 г.

АКТ

внедрения в производство филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» результатов диссертационной работы Беляковой Ольги Валерьевны «Разработка и использование лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, в составе комбинированных вакцин».

Разработана технология получения лиофилизированной формы синтетической конъюгированной вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b* и спецификация готового препарата

Составлены проект Нормативной документации и Опытно-промышленного регламента на производство препарата «Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная, синтетическая суспензия для внутримышечного введения в комплексе с лиофилизатом для приготовления суспензии для внутримышечного введения» (ПР № 04862997-992015).

В соответствии с ОПР в цехе вакцинно-сывороточных препаратов филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» были получены три серии комбинированной вакцины «АКДС-Геп В+Ниб» и отконтролированы в соответствии со спецификацией. Результаты контроля показали, что вакцина полностью соответствует требованиям отечественных и международных нормативных документов, предъявляемых препаратам такого класса.

Вакцина «АКДС-Геп В+Ниб», серия П5 от 03.15 передана на клинические испытания.

Начальник цеха
Вакцинно-сывороточных препаратов
филиала АО «НПО «Микроген»
в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»,
к.б.н

Д.В. Грязнова

Начальник отдела контроля качества
филиала АО «НПО «Микроген»
в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»,
к.м.н.

А.Б. Перевозчиков

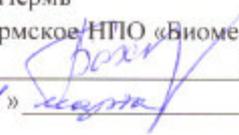
Личные подписи Грязновой Дианы Васильевны и Перевозчикова Антона Борисовича заверяю:

Начальник отдела контроля качества _____ Макарян А.В.

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора по производству
филиала АО «НПО «Микроген»
в г. Пермь

«Пермское НПО «Биомед»,


И.А. Бахтин
«24»  2018 г.

АКТ

внедрения в производство филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» результатов диссертационной работы **Беляковой Ольги Валерьевны «Разработка и использование лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, в составе комбинированных вакцин».**

Разработана технология получения лиофилизированной формы синтетической конъюгированной вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b* и спецификация готового препарата

Составлен проект нормативной документации и утвержден Опытно-промышленный регламент на производство препарата «Вакцина против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша бесклеточная адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная, синтетическая суспензия для внутримышечного введения в комплекте с лиофилизатом для приготовления суспензии для внутримышечного введения» (ПР № 04862997-1002015).

В соответствии с ОПР в цехе вакцинно-сывороточных препаратов филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» были получены три серии комбинированной вакцины «аАКДС-Геп В+Нib» и отконтролированы в соответствии со спецификацией. Результаты контроля показали, что вакцина полностью соответствует требованиям отечественных и международных нормативных документов, предъявляемых препаратам такого класса.

Вакцина «аАКДС-Геп В+Нib», серии П5 от 05.13 и П7 от 11.2016 передана на клинические испытания.

Начальник цеха
Вакцинно-сывороточных препаратов
филиала АО «НПО «Микроген»
в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»,
к.б.н



Д.В. Грязнова

Начальник отдела контроля качества
филиала АО «НПО «Микроген»
в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»,
к.м.н.



А.Б. Перевозчиков

Личные подписи Грязновой Дианы Васильевны и Перевозчикова Антона Борисовича заверяю:

