

*На правах рукописи*

**БЕЛЯКОВА ОЛЬГА ВАЛЕРЬЕВНА**

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

14.04.01 - Технология получения лекарств

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

**Пермь – 2018**

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, доцент **Николаева Алевтина Максимовна**

**Официальные оппоненты:**

**Петров Александр Юрьевич** - доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармации и химии, исполняющий обязанности заведующего кафедрой;

**Игнатьев Георгий Михайлович** - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» заместитель директора по производству.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург.

Защита диссертации состоится «26» декабря 2018 г. в 12.00 на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2. Тел./факс (342)233-55-01.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы.

Инфекция, вызываемая *Haemophilus influenzae* тип *b* (Ніb-инфекции), обуславливает тяжелые инвазивные заболевания, среди которых наиболее частыми являются менингит, сепсис, эпиглоттит и пневмония (Chandran A., 2013, МР N 3.3.1.0001 - 10, ВОЗ 2013). Гемофильная палочка обладает рекордной устойчивостью к антибиотикам, что делает лечение Ніb-инфекции крайне затруднительным даже при использовании самых современных и дорогостоящих препаратов (Зверев В.В., 2011, ВОЗ 2013, Chandran A., 2013, Shuel M. et al., 2014). Единственным надежным средством профилактики заболевания является активная иммунизация (ВОЗ 2013, Jansen K.U., 2018). Создание конъюгированной вакцины для профилактики Ніb-инфекции (Ніb-вакцины), представляющей полисахарид (полирибозилрибитола фосфат, являющийся основным антигеном), ковалентно связанный с белковым носителем, позволило предупреждать инвазивную Ніb-инфекцию (Zarei A. E. et al., 2016, Cavallari M., 2017, Ladhani S.N., 2012). В настоящее время вакцинация против данной инфекции проводится в 120 странах мира, с 2011 года вакцина против Ніb-инфекции включена в Национальный календарь профилактических прививок Российской Федерации для иммунизации детей из групп риска (приказ Минздрава России от 21.03.2014 № 125н).

Увеличение числа прививок, регламентируемых национальными календарями различных стран, потребовало внедрения в практику комбинированных вакцин. Между тем, перечень отечественных комбинированных вакцин для использования в рамках реализации Национального календаря профилактических прививок ограничен. Компанией ОА «НПО «Микроген» Минздрава России (филиал в г. Пермь «Пермское «НПО «Биомед») уже много лет выпускаются комбинированные вакцины для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша и гепатита В (АКДС и АКДС-ГепВ), которые широко применяются для вакцинации детей раннего возраста в России, разработана оригинальная технология производства бесклеточной коклюшной вакцины (пат. №2504399) и проведены исследования по включению ее в состав комбинированных вакцин (Николаева А.М. и др., 2014).

Особо следует отметить, что разработка комбинированных вакцин является сложной задачей. Так, например, в некоторых исследованиях отмечены случаи снижения иммунного ответа на Ніb-антиген в составе комбинированных вакцин, связанные с несовместимостью с адьювантом алюминия гидроксидом (Egan W., et al., 1981, Sturgess A.W. et al., 1999, Chandran A., 2013). Включение Ніb компонента в состав комбинированных вакцин в форме лиофилизата позволяет сохранить его иммунологическую активность и повысить стабильность вакцины в процессе хранения (Chen D. et al., 2010, Josefsberg J.O., 2012, Kraan H. et al., 2014, Wasserman A., 2015). В связи с этим, разработка лиофилизированной формы Ніb-вакцины для последующего

ее включения в состав отечественных комбинированных вакцин является актуальной. При этом неотъемлемой частью разработки являются всесторонние исследования, доказывающие эффективность использования лиофилизата Ніб-компонента в составе комбинированных вакцин.

#### **Степень разработанности темы диссертации.**

В настоящее время во всем мире для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В, полиомиелита и Ніб-инфекции применяют комбинированные вакцины, перечень которых весьма широк, а эффективность доказана в многочисленных исследованиях (Plotkin S.A. et al., 2012, McCormack P.L., 2013, Syed Y.Y., 2016). 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 Ніб-инфекции.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы 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 Ніб), в соответствии с требованиями, предъявляемыми Европейской Фармакопеей 8 издания к субстанциям конъюгированных вакцин для профилактики Ніб-инфекции. Установить нормы качества и разработать спецификацию субстанции Ніб.
2. Разработать и стандартизировать технологию получения лиофилизированной формы синтетической Ніб-вакцины.
3. Установить нормы качества и разработать спецификацию лиофилизированной формы Ніб-вакцины.
4. Изучить токсическое действие полученной лиофилизированной формы Ніб-вакцины в опытах на животных.
5. Экспериментально обосновать конструкции комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и Ніб-инфекции.
6. Разработать проект нормативной документации (НД) на лиофилизированную Ніб-вакцину для включения в опытно-промышленные регламенты (ОПР) на комбинированные вакцины АКДС-ГепВ+Ніб и аАКДС-ГепВ+Ніб.

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

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

Впервые установлено, что иммуногенность Hib-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-производственных серий лиофилизированной Hib вакцины, которые были включены в состав комбинированных вакцин АКДС-ГепВ+Hib и аАКДС-ГепВ+Hib (по три серии каждой вакцины, акты внедрения от 21.03.2018 и 28.03.2018 соответственно).

На основании проведенных исследований разработаны:

1. Проекты 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)».

2. Проекты 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 Hib-инфекции у детей.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Обоснование выбора показателей качества и результаты валидации методов контроля субстанции Hib, спецификация.

2. Состав и технология получения лиофилизированной синтетической Hib-вакцины.

3. Обоснование выбора показателей качества и результаты валидации методов контроля лиофилизированной синтетической Hib-вакцины, спецификация. Результаты изучения физико-химических свойств и иммуногенности лиофилизированной Hib-вакцины.

4. Результаты изучения острой и хронической токсичности, местного раздражающего действия и специфической безопасности лиофилизированной Hib-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 Научно-производственного объединения «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 ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации» (№ 01.9.50007417).

**Публикации.** 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 ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации 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 рисунками, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав экспериментальных исследований, заключения, списка литературы, включающего 191 источников, из них 56 отечественных и 135 иностранных авторов, приложений на 11 с.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Первая глава** посвящена анализу данных литературы, касающихся характеристики возбудителя гемофильной инфекции тип b, клинических форм и эпидемиологических особенностей гемофильной инфекции, представлены данные о заболеваемости H1b-инфекцией в Российской Федерации и странах мира. Особое внимание уделено вакцинации, как основной

мере профилактики Hib-инфекции. Дана характеристика впервые разработанным, а также современным вакцинам, используемым в мире с целью профилактики Hib-инфекции. Рассмотрены некоторые подходы к созданию конъюгированных вакцин.

**Вторая глава** включает описание объектов и методов исследования.

Объектом исследования, а так же сырьем для получения вакцины являлась активная фармацевтическая субстанция синтетического полирибозилрибитола фосфата (PRP), конъюгированного с белком носителем столбнячным анатоксином (субстанция Hib), производства Центра Генной инженерии и Биотехнологии (ЦГИБ) Республики Куба.

Исследования на животных проводили на базе АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). Все животные получены из филиала «Андреевка» Научного Центра Биомедицинских Технологий РАМН.

Определение рН исследуемых серий субстанции и растворов вакцины выполняли потенциометрическим методом; белка – методом Лоури без предварительного осаждения; стерильности - методом прямого посева; бактериальных эндотоксинов – методом ЛАЛ-теста (в хромогенном тесте по конечной точке, метод Е); пирогенности и аномальной токсичности – биологическим методом в соответствии с ГФ XIII изд.; механических включений в вакцине – визуально; потери в массе при высушивании – весовым методом; осмоляльности - криоскопическим в соответствии с ГФ XIII издания.

Иммуногенность столбнячного, дифтерийного и цельноклеточного коклюшного компонента определяли в тестах на животных в соответствии с ГФ XIII издания.

**Физико-химические методы.** Количественное определение PRP в субстанции Hib и Hib-вакцине проводили колориметрическим методом с орциноловым реактивом и коммерческой D-рибозой. Количественное содержание свободного PRP в субстанции Hib устанавливали 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).

Определение остаточных функциональных групп в субстанции Hib проводили спектрофотометрическим методом с реактивом Элмана.

Молекулярные параметры субстанции Hib, а также содержание остаточных реагентов, исследовали методом гель фильтрационной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГФ-ВЭЖХ).



**Иммунохимические и иммунобиологические методы.** Определение подлинности белканоносителя субстанции Hib и полноты сорбции дифтерийного и столбнячного компонентов комбинированных вакцин проводили с помощью набора реагентов «Тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаггутинации (ТН-ДСК-КОА)» (ТУ 9388-164-14237183-2012) в соответствии инструкцией по применению. Набор укомплектован диагностикумами на основе аффинно-очищенных антител кролика против столбнячного, дифтерийного анатоксина и против антигенов *B. pertussis*, сорбированных на белке А инактивированного стафилококка штамма Cowan I, контрольными положительными образцами и концентратом для приготовления 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора, pH (7,3±0,1). Оценку результатов реакции проводили по общепринятой 4-х крестной системе. Реакцию считали положительной при образовании четко выраженной агглютинации с гомологичным диагностикумом (не менее чем на 3 креста).

Иммуногенную активность Hib-вакцины и комбинированных вакцин оценивали в опытах на кроликах. Иммунизацию проводили двукратно внутримышечно в дозе 0,5 мл. Определение антител к полисахариду *H. influenzae* тип *b* проводили методом ИФА с помощью тест-систем «Rabbit Anti-*Haemophilus influenzae* type *b* IgG ELISA Assay» («XpressBio», США); к коклюшным антигенам, дифтерийному и столбнячному анатоксинам с помощью тест-систем иммуноферментных для определения коклюшных, дифтерийных, столбнячных антител в сыворотках крови животных (кролик, морская свинка, мышь) (филиал АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»); к поверхностному антигену вируса гепатита В с помощью тест-системы «МикрАТ-НВ» (филиал АО «НПО «Микроген» в г. Нижний Новгород «ИмБио»).

В качестве препаратов сравнения использовали моновакцины для профилактики Hib-инфекции: Акт-ХИБ® (полисахарид капсулы Hib, конъюгированный со столбнячным анатоксином производства «Sanofi Pasteur», Франция), Хиберикс® (полисахарид капсулы Hib, конъюгированный со столбнячным анатоксином производства «GlaxoSmithKline», Бельгия), Кими-Хиб® (синтетический полисахарид, идентичный капсульному, конъюгированный со столбнячным анатоксином производства «HeberBiotech», Республика Куба) и комбинированные вакцины: Пентаксим® (вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомиелита инактивированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная производства «Sanofi Pasteur», Франция) и АКДС-ГепВ (вакцина для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В адсорбированная жидкая производства филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»).

Специфическую безопасность субстанции Hib и Hib-вакцины изучали в опытах на морских свинках: при исследовании субстанции Hib морским свинкам вводили препарат в пятикратной разовой дозе, рекомендуемой для человека (50 мкг PRP, 2,5 мл под кожу

внутренней поверхности верхней трети бедра); при исследовании Ніб-вакцины препарат вводили в количестве, равном шести прививочным дозам для человека (60 мкг PRP, подкожно по 1,5 мл в бок и лапку).

Токсическое действие Ніб-вакцины изучали в экспериментах на беспородных мышах. Исследования проведены на 180 животных. Каждая группа включала 5 самцов и 5 самок. При определении «острой» токсичности б/п мышам вводили Ніб-вакцину сер. 1 внутривенно однократно в двух дозах: 1,9 мкг (10 доз) и 19 мкг (100 доз) в объеме 0,5 мл. При определении «хронической» токсичности Ніб-вакцину с. 1 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). По аналогичным схемам животным группы сравнения вводили физиологический раствор. Период наблюдения составлял 14 суток после окончания введения препарата. Исследование местного раздражающего действия Ніб-вакцины проводили на кроликах массой 2,0-2,5 кг (4 кролика в возрасте 3-4 месяцев) по модифицированному методу Драйза (Миронов А.Н., 2012).

**Статистические методы.** Статистический анализ результатов проводили с применением методов описательной статистики. В работе использовали электронные таблицы Excel для Windows (Microsoft). Для оценки значимости межгрупповых различий использовали парный и непарный t-критерий Стьюдента, различия или показатели связи считались значимыми при  $p < 0,05$ , а также медианы и их 95%-е доверительные интервалы по Ван дер Вардену. 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).

**Третья глава** посвящена исследованиям, направленным на разработку методов контроля субстанции Ніб.

Фармацевтические субстанции, использующиеся для производства вакцинного препарата и являющиеся его активным ингредиентом, должны проходить строжайший контроль на всех этапах производственного цикла, что в свою очередь способствует гарантии качества готового препарата.

Технология производства активной фармацевтической субстанции Ніб 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 ядерно-магнитного резонанса (ЯМР). Возможность анализировать одновременно несколько

примесей является преимуществом этого метода, однако зачастую требуется специальная подготовка анализируемого образца, а стоимость самого анализа очень высока. Кроме того, не каждая аналитическая лаборатория может быть оснащена таким дорогостоящим оборудованием. В связи с этим для определения остаточного содержания примесей в субстанции Нib были предприняты исследования по использованию для этой цели обращенно-фазовой хроматографии<sup>1</sup>. В результате проведенных исследований разработан оригинальный способ (пат. № 2621645), согласно которому детектирование примесей проводили в режиме градиентного элюирования (Таблица 1) на аналитической колонке Kromasil 100 5C18 (150\*4,6 мм, AkzoNobel), в течение одного анализа продолжительностью 17 мин, одновременно регистрируя сигнал при 210 (для ДМСО и НЭМ) и 245 нм (для CuЭДТА).

Таблица 1

Программа градиентного элюирования

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

В приведенных выше условиях проведения анализа обеспечивалось требуемое разделение примесей ЭДТА, ДМСО и НЭМ от компонентов субстанции Нib ( $R_s > 1,5$ ). Чувствительность метода достаточна для детектирования 0,85 нг ЭДТА в форме комплекса с катионами меди, 0,56 нг ДМСО и 0,05 нг НЭМ, что в несколько раз ниже их предельно допустимого содержания в субстанции. Наличие примесей регистрировали путем детекции пиков CuЭДТА, ДМСО и НЭМ на хроматограмме субстанции. Исследуемые серии субстанции Нib примесей не содержали.

Иммунологические свойства и защитная эффективность любой конъюгированной вакцины напрямую взаимосвязаны с молекулярным размером и структурными свойствами конъюгата. Поэтому следующим шагом наших исследований являлось определение молекулярных параметров субстанции, для которого были отработаны условия проведения анализа гель-фильтрационной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ-ГФ) с использованием колонки TSKgel G5000PWx1. При этом на хроматограмме субстанции Нib выявлялся один основной пик (>90%) со временем удерживания около 13,7 мин, значение коэффициента распределения находилось в диапазоне 0,32-0,33. Таким образом, были установлены требования: площадь пика основного компонента  $\geq 90$  %, константа распределения  $K_d \leq 0,46$ . Проведена валидация методики определения молекулярных параметров субстанции Нib. Показана специфичность методики. Относительное стандартное

<sup>1</sup> Работа выполнена совместно с сотрудниками отдела инновационных проектов АО «НПО «Микроген» в г. Москва

отклонение (RSD) по результатам оценки сходимости и внутрилабораторной прецизионности не превышало 3,0 и 5,0 % соответственно.

Согласно требованиям ВОЗ и Европейской Фармакопеи (ЕФ) должны быть определены способы оценки подлинности используемых субстанций. В связи с этим для оценки подлинности полисахаридной составляющей конъюгата нами предложено использовать колориметрический метод с орцином, а для белка-носителя столбнячного анатоксина - оригинальный метод реакция коаггутинации (РКОА).

При помощи фармакопейных методов анализа было установлено, что значение рН исследуемых серий субстанции лежало в интервале от 6,87 до 7,14, видимые механические включения отсутствовали. Серии субстанции Ніб были стерильны, апиrogenны, содержание бактериальных эндотоксинов не превышало 10 ЕЭ/мкг PRP. В опытах по изучению аномальной токсичности не было выявлено признаков столбнячной интоксикации и снижения массы тела животных, что свидетельствовало об отсутствии токсического действия исследуемой субстанции.

Проведена оценка субстанции по показателям: содержание общего и свободного PRP, белка, остаточных функциональных групп, отношение PRP к белку. В результате валидационных исследований установлено, что предложенные методики могут быть использованы для достоверной оценки качества субстанции Ніб.

На основании проведенных исследований составлен проект Нормативной Документации на субстанцию «Вакцина для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная синтетическая, субстанция». Результаты анализа исследуемых серий субстанции в соответствии со спецификацией представлены в таблице 2.

Таким образом, субстанция Ніб, производства HeberBiotech (Республика Куба), полностью соответствует требованиям, предъявляемым ЕФ и отечественными регулирующими документами, к субстанциям конъюгированных Ніб-вакцин и может быть использована для производства вакцинных препаратов.

Таблица 2

## Спецификация субстанции Ніб

Показатели	Методы	Нормы	Результат (M±m)
1	2	3	4
Описание	Визуальный	Прозрачная светло-желтая жидкость, не содержащая взвешенных частиц	Соответствует
Подлинность: Белок-носитель	РКОА	Должны образовываться агглютинаты со столбнячным диагностикумом	Соответствует
Подлинность	Колориметрический с	Должно быть окрашивание	Соответствует

1	2	3	4
PRP	орцином	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	7,12±0,02
Распределение по размеру молекул	ВЭЖХ (гель-фильтрация), ГФ XIII, ОФС.1.2.1.2.0005.15	Основной пик не менее 90 %, Kd ≤0,46	0,33±0,01
Остаточные функциональные группы	Метод Элмана/Лоури	Не более 5 мкмоль SH/мкмоль столбнячного анатоксина	Отсутствуют
Посторонние примеси: - НЭМ - ЭДТА - ДМСО	ВЭЖХ-ОФ	Не более 1 мкг/мл Не более 3,4 мкг/мл Не более 1,4 мкг/мл	Отсутствуют
Специфическая безопасность столбнячного анатоксина	Биологический	Должна быть безопасной	Безопасна
Пирогенность	Биологический, ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0005.15	Должна быть апиrogenной	Апиrogenна
Стерильность	Метод прямого посева, ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0003.15	Должна быть стерильной	Стерильна
Соотношение PRP:столбнячный анатоксин	Расчетный Колориметрический с орцином/Лоури	От 0,32 до 0,48	0,37±0,04
Содержание PRP	Колориметрический с орцином	Не менее 0,5 мг/мл	0,530 - 1,358
Содержание столбнячного анатоксина (белок)	Метод Лоури, ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0023.15	Не менее 1,04 мг/мл	1,41 - 3,63
Содержание свободного PRP	Метод центрифужной ультрафильтрации Колориметрический с орцином	Не более 20 % от номинальной величины	0,82±0,30

**Четвертая глава** посвящена разработке технологии получения готовой лекарственной формы Нib-вакцины на основе субстанции синтетического PRP, конъюгированного со столбнячным анатоксином, обоснованию методов контроля и стандартизации, изучению стабильности.

Одним из наиболее распространенных методов повышения стабильности лекарственных препаратов является лиофилизация (Николаева Л.Л. и др., 2017, Гусаров Д.А., 2010, Robinson A., 2003, Wasserman A., 2015). В ходе процесса лиофилизации вакцинный препарат подвергается воздействию множества стрессовых факторов, которые могут привести к снижению или потере эффективности вакцины. В связи с этим первоначально были проведены исследования по конструированию защитной среды для лиофилизации вакцины, которые

включали проведение сравнительного изучения протективных свойств углеводов, используемых в составе разрешенных к применению в РФ вакцин для профилактики гемофильной инфекции тип *b*: сахарозы и лактозы. Выбор вспомогательных компонентов готовой лекарственной формы Нib-вакцины проводили на основании анализа комплексной оценки оказываемого защитного действия. В испытуемых образцах определяли показатели растворимости, рН, осмоляльности, остаточной влажности и визуально оценивали качество сухой массы по наличию дефектов ее структуры. Установлено, что включение в состав вакцины сахарозы в концентрации 8,5 % обеспечивало образование плотной пористой массы вакцины и сохранение требуемых значений растворимости, рН, осмоляльности и остаточной влажности при лиофилизации. В ходе исследований был подобран оптимальный состав Нib-вакцины (Таблица 3).

Таблица 3

## Состав одной дозы готовой лекарственной формы Нib-вакцины

Компонент вакцины	Количество в одной дозе (0,5 мл)
<i>Активный компонент:</i> Полирибозилрибитола фосфат, конъюгированный со столбнячным анатоксином Столбнячный анатоксин конъюгированный (АО «Эбер Биотек», Республика Куба, номер реестровой записи – № ФС-000757)	10±2 мкг от 20 до 31 мкг
<i>Вспомогательные вещества:</i> Сахароза Натрия дигидрофосфат Динатрия гидрофосфат	42,50 мг 0,16 мг 0,50 мг

Розлив стерильного раствора Нib-вакцины осуществляли на автоматической разливочной машине БОШ AVRФ-0,4 по 0,5 мл в ампулы ШП-2 (изготовленные из боросиликатного стекла первого гидролитического класса, вместимостью 2 см<sup>3</sup>), что составляло 25% объема при высоте столба (9±1) мм. Лиофильное высушивание препарата проводили в сублимационной установке ТГ-50 (Германия) с номинальным объемом загрузки 50 л, площадью загрузки 3,8 м<sup>3</sup> на базе филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед». Запайку ампул с высушенным препаратом производили на машине для запайки ампул А6/FA «MACOFAR», которая оснащена цепным перемещением ампул в узлы запайки ампул, выгрузки.

Отработку процесса высушивания проводили с учетом его влияния на физические свойства и специфическую активность лиофилизированной вакцины. В результате был отработан следующий режим лиофильного высушивания Нib-вакцины: замораживание препарата при температуре минус (40±5) °С и выдерживание при этой температуре не менее 8 часов; проведение стадии сублимационного высушивания в режиме интенсивного нагрева полок со скоростью (15 ± 5) °С в час до конечной температуры (35 ± 4) °С при глубине вакуума

не менее 16 Па, температуре конденсатора не выше минус 50 °С; досушивание препарата до уровня остаточной влаги не превышающего 3 % при плюсовых температурах в течение 15 часов. Таким образом, общая продолжительность процесса сублимации составила (30±4) часов, конечная температура препарата - (33±4) °С.

По разработанному режиму лиофилизации было получено 6 серий Ніб-вакцины. Показано, что параметры технологического процесса лиофилизации находились в пределах установленных границ и воспроизводились от серии к серии.

Стабильность лиофилизированной Ніб-вакцины определяли путем оценки основных показателей качества (внешний вид, растворимость, подлинность, содержание свободного и конъюгированного PRP) в стресс испытаниях (хранение при температуре (50±2) и (60±2)°С в защищенном от света месте в течение 19 суток), методом ускоренного старения (хранение при температуре (37±2) °С в защищенном от света месте в течение 53 суток) и методом долгосрочных испытаний (хранение при температуре от 2 до 8°С в защищенном от света месте в течение 36 месяцев). Исследование проводили на трех сериях Ніб-вакцины, за исключением стресс испытаний, которые проводили на одной серии. Выполненные исследования стабильности показали, что качество вакцины в заявленной первичной упаковке (по 0,5 мл в ампулах вместимостью 2 мл по ISO 9187 из стекла 1 гидролитического класса) сохранялось на протяжении 3 лет хранения при температуре от 2 до 8°С.

Одним из основных требований, предъявляемых к вакцинным препаратам, является оценка их подлинности и специфической активности. В РКОА была установлена подлинность белковой составляющей вакцины: каждая исследуемая серия лиофилизированной Ніб-вакцины давала четко выраженную положительную агглютинацию со столбнячным диагностикумом. Подлинность полисахарида, а также количественное содержание PRP устанавливали колориметрическим методом с орциноловым реактивом.

Поскольку в предварительных исследованиях было установлено, что присутствие сахарозы не позволяет достоверно определять количественное содержание PRP в лиофилизате Ніб-вакцины, были проведены исследования по разработке процесса пробоподготовки, которая заключалась в проведении фильтрации испытуемых образцов Ніб-вакцины с помощью центрифужных ультрафильтрационных ячеек до полного удаления сахарозы из образца. Введенная стадия пробоподготовки испытуемых растворов Ніб-вакцин, позволяя полностью удалять сахарозу, обеспечивала получение достоверных результатов при определении PRP в лиофилизированной форме конъюгированных Ніб-вакцин. Общее содержание PRP в исследуемых сериях Ніб-вакцины находилось в диапазоне от 8,83 до 10,20 мкг/доза (0,5 мл). Содержание свободного PRP в лиофилизированной Ніб-вакцине, определенное расчетным методом, исходя из номинального содержания PRP в одной дозе препарата (10 мкг), не

превышало допустимого значения и составляло менее 20 % от номинальной величины. Линейная зависимость между оптической плотностью растворов и концентрацией PRP в образцах установлена в диапазоне концентраций 2,5-40 мкг/мл ( $r^2=0,9996$ ). Правильность в пределах применения аналитической методики составила 93,33-109,21%, сходимость и внутрिलाбораторная прецизионность составила менее 5,0 и 10,0 % соответственно.

Далее представлялось целесообразным изучить иммуногенные свойства лиофилизированной Hib-вакцины. Иммунизация кроликов Hib-вакциной приводила к образованию антител к полисахариду *H. influenzae* тип *b* у 100% привитых животных после второй иммунизации (Таблица 4). Следует отметить, что конъюгированная синтетическая Hib-вакцина индуцировала образование гемофильных антител практически на одном уровне с препаратами сравнения Хиберикс® и Акт-ХИБ®, содержащими капсульный полисахарид ( $p>0,05$ , Таблица 4). При этом иммунный ответ на столбнячный анатоксин оставался минимальным, что отвечает требованиям Европейской Фармакопеи 8 издания, предъявляемым к белкам-носителям конъюгированных вакцин.

Таблица 4

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

Наименование образца (лекарственная форма)	Компоненты вакцин	
	Столбнячный, МЕ/мл	Hib, мкг/мл
Акт-ХИБ® с. G1012-2 (лиофилизат)	0,046 [0,008-0,266]	17,191 [2,990-97,750]
Хиберикс® с. 12060709 (лиофилизат)	0,050 [0,020-0,140]	15,900 [6,600-38,200]
Кими-Хиб® с. ОН1302/0 (жидкая)	0,040 [0,008-0,191]	15,284 [7,293-32,033]
Hib-вакцина с. 1 (лиофилизат)	0,040 [0,010-0,120]	16,91 [2,050-89,210]

Проведенные всесторонние исследования послужили основанием для разработки спецификации качества на лиофилизированную синтетическую Hib-вакцину, максимально отражающую все требования, предъявляемые Европейской Фармакопеей 8 издания и ВОЗ к конъюгированным Hib-вакцинам. Результаты контроля препарата в соответствии со спецификацией представлены в таблице 5.

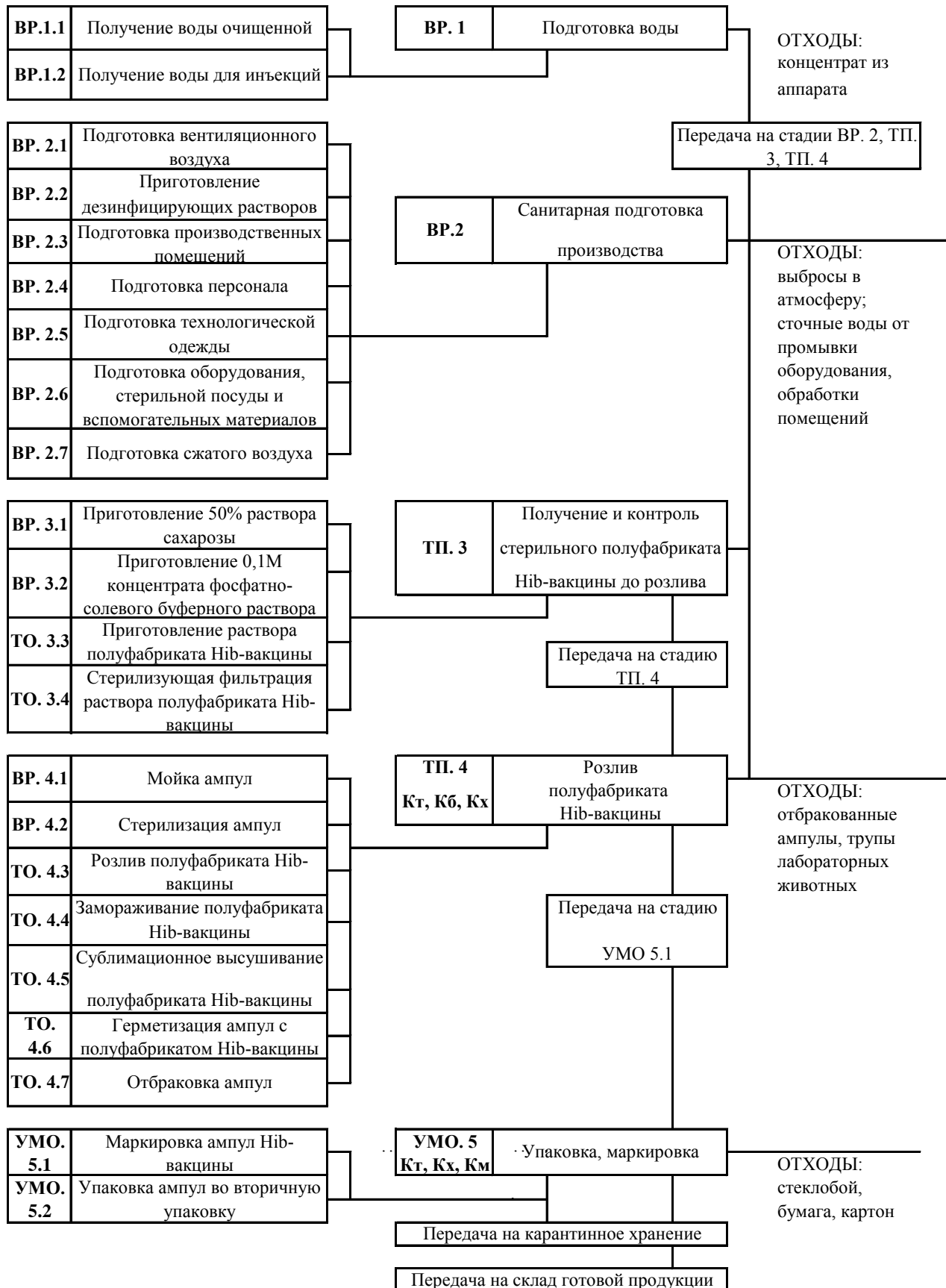
Разработанные и прошедшие валидацию методы контроля Hib-вакцины были включены в проекты НД на пентавакцины АКДС-ГепВ+Hib и аАКДС-ГепВ+Hib.

Итогом проведенных исследований стала разработка технологии производства лиофилизированной синтетической Hib-вакцины, схема которой представлена на рисунке 1.



Спецификация лиофилизированной Hib-вакцины

Показатели	Методы	Нормы	Результат (M±m)
Описание	Визуальный	Аморфная масса белого цвета	Соответствует
Подлинность Полисахарид	Колориметрический с орцином	Должно наблюдаться окрашивание раствора препарата в зеленый цвет.	Соответствует
Белок-носитель	Реакция коаггутинации (РКОА)	Должны образовываться агглютинаты со столбнячным диагностикумом.	Соответствует
Механические включения	Визуальный, ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0005.15	Видимые механические включения должны отсутствовать.	Отсутствуют
pH	Потенциометрический, ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0004.15	От 6,4 до 7,4	6,87±0,23
Осмоляльность	Криоскопический, ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0003.15	Не менее 200 мОсмоль/кг	364±23,76
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	Соответствует
Потеря в массе при высушивании	Весовой, ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0010.15	Не более 3 %	1,74±0,43
Стерильность	Метод прямого посева, ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0003.15	Должна быть стерильной	Стерильна
Пирогенность	Биологический, ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0005.15	Должна быть апиrogenной	Апиrogenна
Аномальная токсичность	Биологический, ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0004.15	Должна быть нетоксичной	Нетоксична
Специфическая безопасность	Биологический	Должна быть безопасной	Безопасна
Специфическая активность	Биологический	Должен вызывать выработку антител не менее чем у 50 % животных (кроликов)	100
Иммуногенность	Колориметрический с орцином	Должно быть в пределах ± 20 % от номинальной величины	94,6±4,21
Содержание PRP	Расчетный/ Колориметрический с орцином	Не более 20 %	5,42±4,21
Содержание свободного PRP	Расчетный/ Колориметрический с орцином	Не более 20 %	5,42±4,21
Содержание конъюгированного столбнячного анатоксина, мкг/мл	Метод Лоури без предварительного осаждения, ГФ XIII, ОФС.1.2.3.0012.15	От 40 до 62 мкг/мл	50,03±1,21
Упаковка	По одной прививочной дозе в ампулах из стекла.		
Хранение	При температуре от 2 до 8°C 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. 1. Технологическая схема производства Hib-вакцины.

**Пятая глава посвящена** лабораторно-экспериментальному изучению общетоксических свойств лиофилизированной Ніб-вакцины в опытах на животных.

Исследование «острой» и «хронической» токсичности Ніб-вакцины показало, 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 (Таблица 6), изменениям волосяного покрова, 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. Местно-раздражающего действия препарата также не было выявлено.

Таблица 6

Изменение массы тела беспородных мышей при изучении острой и хронической токсичности Ніб-вакцины

Срок эвтаназии	Опыт (масса тела, г)		Контроль (масса тела, г)
	10 доз	100 доз	Раствор натрия хлорида 0,9 %
<b>Острая токсичность</b>			
24 часа	15,93±1,00	15,17±0,91	15,61±0,87
7 суток	19,41±1,04	18,17±1,87	18,81±1,12
14 суток	21,41±1,04	21,32±1,59	20,84±1,15
<b>Хроническая токсичность</b>			
24 часа	22,05±0,62	22,84±1,05	21,41±2,14
7 суток	25,22±1,24	25,56±1,07	25,37±0,78
21 сутки	28,42±1,48	28,98±1,70	29,17±0,58

Макроскопическое исследование показало, что внутренние органы всех животных имели характерные признаки, расположение и строение: различий между опытными и контрольной группами выявлено не было.

Таким образом, в результате проведенных исследований не обнаружено признаков токсического воздействия препарата на организм подопытных животных.

**В шестой главе** представлено обоснование возможности включения лиофилизированного Ніб-компонента в состав комбинированных вакцин на основе АКДС.

Трудности создания комбинированных вакцин связаны, прежде всего, с решением проблемы совместимости компонентов, стабильности и сохранения достаточной иммуногенности препарата (Медуницын Н.В., 2005, Decker M.D., 2013). 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 на первом этапе работы было проведено экспериментальное изучение совместимости и конкурентности пяти компонентов (дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и гемофильного) в составе двух вариантов вакцин: АКДС-ГепВ+Ніб с цельноклеточным

коклюшным компонентом, аАКДС-ГепВ+НіВ с бесклеточным коклюшным компонентом (Таблица 7). Для сведения вакцины в одну лекарственную форму к содержимому ампулы с НіВ компонентом (лиофилизату) добавляли при помощи шприца содержимое ампулы с суспензией АКДС-ГепВ или аАКДС-ГепВ, полученную смесь встряхивали. После полного восстановления лиофилизата препарат представлял собой гомогенную суспензию белого цвета.

Таблица 7

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

Препарат и серия	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+НіВ	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+НіВ	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]
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]
НіВ-вакцина с. 3 (лиофилизат)	-	0,115 [0,078-0,169]	-	-	12,434 [4,796-32,232]

Примечание: \* - Иммуноферментные единицы

\*\* - Различия достоверны при сравнении с НіВ-вакциной с.3.

Из представленных данных видно, что иммунизация кроликов экспериментальными вариантами комбинированных вакцин приводила к формированию напряженного иммунитета в отношении всех компонентов, не было отмечено достоверных отличий уровня антител (дифтерийных, столбнячных, коклюшных, анти-НВs, гемофильных), индуцируемых различными вариантами сравниваемых комбинаций ( $p > 0,05$ ). При этом совместное применение АКДС-ГепВ или аАКДС-ГепВ вакцины и НіВ-вакцины заметно усиливало иммуногенность НіВ-компонента по сравнению с монопрепаратом ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, в результате проведенных исследований была экспериментально обоснована возможность получения комбинированных препаратов для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и НіВ-инфекции и сконструирована лекарственная форма комбинированных вакцин (АКДС-ГепВ+НіВ и аАКДС-ГепВ+НіВ): суспензия для

внутримышечного введения в комплекте с лиофилизатом для приготовления суспензии для внутримышечного введения.

Проведенные исследования, показавшие эффективность лиофилизированной Hib-вакцины в составе вакцин АКДС-ГепВ+Hib и аАКДС-ГепВ+Hib послужили основанием для включения технологии ее изготовления в проекты опытно-промышленных регламентов на данные комбинированные вакцины и разработки проектов нормативной документации.

В производственных условиях по разработанной технологии изготовлены экспериментально-производственные серии комбинированных вакцин АКДС-ГепВ+Hib и аАКДС-ГепВ+Hib (по три серии каждой вакцины).

Изучение физико-химических свойств (рН, содержание формальдегида, полнота сорбции, содержание алюминия гидроксида), стерильности, токсичности, специфической безопасности, подлинности показало, что комбинированные вакцины для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и Hib-инфекции полностью соответствуют требованиям, предъявляемым отечественными и международными нормативными документами к препаратам такого класса, а по показателям иммуногенности превышают эти требования (Таблица 8).

Таблица 8

Результаты изучения иммуногенных свойств экспериментальных серий комбинированных вакцин в опытах на животных

Наименование препарата	Дифтерийный, МЕ/мл	Столбнячный, МЕ/мл	Коклюшный, МЕ/мл	Гепатитный, относительная потенция	Hib, % сероконверсии
Требования ВОЗ	Не менее 60	Не менее 120	Не менее 8	Не менее 0,5	Не менее 50%
АКДС-ГепВ+Hib	89,07±6,82	278,17±62,66	14,30±4,88	1,07±0,08	100
аАКДС-ГепВ+Hib	70,83±4,91	140,64±10,70	12,83±1,59	0,78±0,06	100
АКДС-ГепВ	123,10±6,52	228,20±51,30	10,90±0,86	1,09±0,06	-

Вакцины АКДС-ГепВ+Hib и аАКДС-ГепВ+Hib прошли клинические испытания, которые показали их хорошую переносимость, высокий профиль безопасности и выраженную иммуногенность. Проведенные исследования позволили рекомендовать комбинированные вакцины АКДС-ГепВ+Hib и аАКДС-ГепВ+Hib для массового применения в рамках Национального календаря профилактических прививок в качестве базового препарата для иммунизации детей (Фельдблюм И.В. и др., 2016, 2018, Романенко В.В. и др., 2018).

### 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 обращенно-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 Hib-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 Hib-вакцине не превышало 12 % (при норме  $\leq 20\%$ ). Установлен срок годности препарата - 3 года хранения при температуре от 2 до 8 °C.

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

4. Установлено, что лиофилизированная Hib-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 Hib-инфекции - АКДС-ГепВ+Hib и аАКДС-ГепВ+Hib 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+Hib и аАКДС-Геп В+Hib.

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

**СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Белякова, О.В.** Конструирование комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В, НВ-инфекции / **О.В. Белякова, О.Ю. Соснина** // Человек и лекарство: Сб. матер. XX Рос. национального конгресса. – Москва, 2013. – С. 397 (РИНЦ).
2. **Белякова, О.В.** Разработка методов контроля вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* типа *b* (Ніb-вакцины) / **О.В. Белякова, О.Ю. Соснина** // Человек и лекарство: Сб. матер. XX Рос. национального конгресса. – Москва, 2013. – С. 294 (РИНЦ).
3. Николаева, А.М. Оценка иммуногенных свойств синтетической Ніb-вакцины в составе комбинированных вакцин / А.М. Николаева, О.Ю. Соснина, **О.В. Белякова** // Инфекционные болезни: Научно-практический журнал Национального научного общества инфекционистов – 2013. – Т. 11, приложение №1 Материалы V Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням Москва, 25-27 марта 2013. – С. 284 – 285 (РИНЦ).
4. 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 (РИНЦ).
5. **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 (РИНЦ, включен в перечень ВАК).
6. Николаева, А.М. Доклинические исследования новой комбинированной вакцины против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В и гемофильной инфекции типа *B*, содержащей бесклеточный коклюшный компонент / А.М. Николаева, О.Ю. Соснина, **О.В. Белякова, Т.В. Вязникова, Т.М. Афанасьева, М.Н. Языкова** // Российский иммунологический журнал. - 2014. - Т. 8, № 3. - С. 911 - 914 (РИНЦ, включен в перечень ВАК).
7. **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 (РИНЦ, включен в перечень ВАК).
8. 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 обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в фармацевтических субстанциях / В.Н. Купцов, И.С. Ефимова, **О.В. Белякова, А.В. Иванов**;

заявитель и патентообладатель ФГУП НПО Микроген Минздрава Российской Федерации - № 20161101158; заявл. 22.03.2016; опубл. 06.06.2017, Бюл. №16.

9. Фельдблюм, И.В. Результаты многоцентрового клинического исследования новой комбинированной вакцины АКДС-ГепВ+Ніb производства НПО «Микроген» при иммунизации детей 6 месяцев / И.В. Фельдблюм, 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 (РИНЦ, включен в перечень ВАК).

10. **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 (РИНЦ).

11. **Белякова, О.В.** Разработка способа определения примесей этилендиаминтетрауксусной кислоты, диметилсульфоксида и N-этилмалеимида методом обращенно-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 (РИНЦ).



**Белякова Ольга Валерьевна (Россия)**

**Разработка и использование лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, в составе комбинированных вакцин**

Разработан состав и технология лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, на основе субстанции синтетического полирибозилрибитола фосфата, конъюгированного со столбнячным анатоксином. Установлено, что иммуногенность лиофилизированной синтетической Hib-вакцины достоверно не отличается ( $p > 0,05$ ) от иммуногенности коммерческих вакцин Акт-ХИБ® (Франция) и Хиберикс® (Бельгия), содержащих капсульный полисахарид. Разработаны и экспериментально обоснованы конструкции комбинированных вакцин для иммунизации против дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и Hib-инфекции - АКДС-ГепВ+Hib и аАКДС-ГепВ+Hib в виде лекарственной формы - суспензия для внутримышечного введения в комплекте с лиофилизатом для приготовления суспензии для внутримышечного введения.

**Olga V. Beliakova, Russia**

**Development and Use of the Vaccine Freeze-dried Form for Prevention of the Infection Caused by *Haemophilus influenzae* type *b*, as Part of Combination Vaccines**

The composition and technology of the freeze-dried form of the vaccine against *Haemophilus influenzae* type *b*, based on the substance of a synthetic polyribosylribitol phosphate conjugated with the tetanus toxoid, has been developed. It has been demonstrated that the immunogenicity of the freeze-dried synthetic Hib vaccine does not significantly differ ( $p > 0.05$ ) from the immunogenicity of the commercial vaccines Act-HIB® (France) and Hiberix® (Belgium) containing a capsular polysaccharide. There have been designed and experimentally justified compositions of the combined vaccines against diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B and Hib infection - DTwP-HepB+Hib and DTaP-HepB+Hib in the following pharmaceutical form, that is suspension for intramuscular administration, together with the lyophilized powder for the preparation of suspension for intramuscular administration.