

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Чахирова Виктория Анатольевна

**РАЗРАБОТКА ПЕРСПЕКТИВНЫХ АДЬЮВАНТНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
В ПРОЦЕССЕ СОЗДАНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ВАКЦИНЫ ОТ
ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ГРИППА**

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, доцент
Компанцев Дмитрий Владиславович

Пятигорск
2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	14
1.1 Состояние рынка иммунобиологических препаратов	14
1.1 Высокопатогенный птичий грипп H5N1.....	16
1.1.1 Эпидемиология высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N1. Источники и пути передачи инфекции	16
1.1.2 Профилактика и меры борьбы с птичьим гриппом H5N1	18
1.2 Адьюванты. Общая характеристика адьювантов. Классификация	21
1.3 Масляные адьюванты. Монтаниды.....	26
1.4 Проблема создания эмульсионных вакцин.....	29
1.5 Технологические аспекты создания эмульсионных вакцин	30
1.5.1 Влияние состояния эмульсии обратного типа на иммунобиологические свойства инактивированных вакцин	31
1.5.2 Факторы, влияющие на эффективность и функциональные свойства вакцин.....	33
1.5.2.1 Технологические факторы, влияющие на функциональные свойства эмульсионных вакцин.....	33
1.6 Статистическая обработка экспериментальных данных методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорного критерия Тьюки.....	35
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1	37
Заключение по обзору литературы.....	38
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1 Материалы исследования	39
2.1.1 Биологические объекты исследования при конструировании эмульсионных вакцин.....	39
2.1.2 Вспомогательные вещества, эмульгаторы, растворители	40
2.1.3 Используемое оборудование.....	41
2.2 Методы исследования.....	44
2.2.1 Методики определения физико-химических, технологических и иммунологических параметров минеральных масел	44

2.2.2	Технология получения модельных образцов эмульсионных вакцин	46
2.2.2.1	Методы получения масляных адъювантов	46
2.2.2.2	Методы получения инактивированной эмульсионной вакцины	46
2.2.3	Методы контроля качества инактивированной эмульсионной вакцины	48
2.2.4	Методы фармакологических исследований	49
2.3	Математические методы анализа, используемые для обработки экспериментальных данных	51
2.3.1	Статистическая обработка результатов исследований	52
2.4	Дизайн исследования	52
ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ МАСЛЯНОГО АДЪЮВАНТА ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ЭМУЛЬСИОННОЙ ВАКЦИНЫ		
3.1	Выбор эмульгаторов	57
3.1.1	Оценка возможности получения эмульсии, отвечающей требованиям ОФС.1.4.1.0017	59
3.1.2	Изучение совместимости и взаимного влияния, различных эмульгирующих компонентов	65
3.2	Влияние количественного содержания масла и смеси эмульгаторов на основные показатели качества готового продукта	74
3.3	Выбор базового масла	86
3.3.1	Исследование физико-химических свойств минеральных масел	87
3.3.2	Реактогенность и адъювантные свойства масел, входящих в состав масляных адъювантов	89
3.3.3	Влияние марки масла на основные показатели качества эмульсии	92
3.4	Исследование влияния комбинации антиген – масляный адъювант на стабильность опытных образцов эмульсионной вакцины	97
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3		100
ГЛАВА 4 КОНСТРУИРОВАНИЕ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬСИОННОЙ ВАКЦИНЫ		
4.1	Оценка влияния технологических приёмов на основные показатели качества эмульсионной вакцины	104
4.2	Определение типа эмульсии	107

4.3 Контроль дисперсионного состава инактивированных эмульсионных вакцин	109
4.4 Определение стерильности эмульсионных вакцин	111
4.5 Разработка технологической схемы производства эмульсионной вакцины против гриппа птиц типа А подтипа H5N1	112
4.6 Определение стабильности образцов эмульсионных вакцин в процессе хранения для установления сроков годности.....	120
4.6.1 Определение концентрации водородных ионов (рН) образцов эмульсионных вакцин	121
4.6.2 Определение кинематической вязкости эмульсионных вакцин	124
4.6.3 Определение коллоидной стабильности эмульсионных вакцин	128
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4	133
ГЛАВА 5 ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬСИОННОЙ ВАКЦИНЫ.....	135
5.1 Определение безвредности образцов эмульсионных вакцин.....	135
5.2 Определение реактогенности образцов эмульсионных вакцин	136
5.3 Определение пирогенности эмульсионных вакцин	138
5.4 Определение антигенной активности эмульсионных вакцин	140
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5	142
ГЛАВА 6 Обоснование норм качества инактивированной эмульсионной	
вакцины	143
6.1 Описание	143
6.2. Концентрация водородных ионов (рН).....	144
6.3 Стерильность	145
6.4 Кинематическая вязкость	146
6.5 Коллоидная стабильность	147
6.6 Безвредность	147
6.7 Реактогенность	148
6.8 Антигенная активность.....	149
6.9. Пирогенность.....	149
6.10 Упаковка.....	150

6.11 Транспортирование и хранение	151
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6	153
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	155
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	157
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	177
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	178
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	179
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	180
ПРИЛОЖЕНИЕ 4	182

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время в России сложилась сложная ситуация с обеспечением критически важной отрасли сельского хозяйства: производства ветеринарных вакцин, обусловленная зависимостью от импорта как фармацевтических субстанций, так и вспомогательных веществ. Проведенный Россельхознадзором анализ рынка вакцин для профилактики инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц показал, что основными зарубежными поставщиками являются четыре компании, имеющие производственные площадки в США, Франции, Мексике, Нидерландах и Испании. Всё это привело к тому, что к началу 2022 года 297 (70%) вакцин, используемых в России в птицеводстве, имели зарубежное происхождение. Одной из главных инфекционных угроз современности является птичий грипп типа А подтипа H5N1. В России к 2025 году зарегистрировано более 100 вспышек, что привело к многомиллионному уничтожению голов домашней птицы. Эффективной и экономически выгодной мерой по предотвращению вспышек пандемии может стать тотальная вакцинация всего поголовья домашней птицы в фермерских хозяйствах.

В качестве адъюванта в производстве вакцин против гриппа птиц чаще всего используются масляные адъюванты, среди которых лидирующую позицию занимают адъюванты Montanide™ ISA французской компании SEPPIC, поставки которого на сегодняшний день приостановлены в связи с санкционными ограничениями.

Отсутствие конкурентных отечественных адъювантов для производства инактивированных вакцин актуализирует необходимость разработки российских вакцин и адъювантов. Данная необходимость обусловлена современными реалиями политико-экономической ситуации и задачами импортозамещения препаратов зарубежного производства. Так как применение масляных адъювантов в качестве носителя антигенов имеет

наибольшую востребованность отраслю, представляется актуальным разработка технологии противогриппозной вакцины на основе отечественного масляного адьюванта.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время доказана эффективность эмульсионных вакцин для профилактики вируса гриппа птиц типа А подтипа H5N1 и борьбы с ним. Современные вакцинные препараты требуют дальнейшей разработки с точки зрения улучшения адьювантных композиций, так как существующие масляные адьюванты, вызывают ряд нежелательных воспалительных реакций в месте инъекции. Таким образом, разработка новых масляных адьювантов для эмульсионных противовирусных вакцин с использованием отечественных компонентов является актуальной.

Цель исследования

Разработка состава и технологии масляных адьювантов на основе современных минеральных, синтетических масел и неионогенных эмульгаторов для создания отечественной вакцины от высокопатогенного вируса птичьего гриппа типа А подтипа H5N1.

Задачи исследования

1. Подготовить аналитический обзор данных по степени изученности технологических, биофармацевтических, фармакологических аспектов и химических исследований адьювантов различного происхождения.
2. Обосновать выбор вспомогательных веществ и метода конструирования масляных адьювантных композиций на основании анализа обобщённой информации.
3. Провести оценку физико-химических свойств минеральных масел, как основных компонентов масляных адьювантов.
4. Изучить влияние природы и концентрации вспомогательных веществ на основные фармако-технологические и физико-химические свойства масляных адьювантов и эмульсионной вакцины, полученные

экспериментальные данные проанализировать, используя методы описательной статистики.

5. Разработать технологию масляных адъювантных композиций для производства инактивированной эмульсионной вакцины.

6. Разработать состав и технологию инактивированной эмульсионной вакцины против высокопатогенного вируса гриппа птиц типа А подтипа H5N1 и изучить её стабильность.

7. Оценить фармакологическую эффективность и безопасность применения разработанных масляных адъювантных композиций и эмульсионных вакцин на их основе.

8. На основании полученных фармако-технологических и физико-химических свойств полученной инактивированной эмульсионной вакцины установить показатели качества и подготовить проект нормативной документации.

Научная новизна исследования

Впервые для отечественного фармацевтического рынка разработана оригинальная адъювантная композиция на основе минерального масла «Rajol» (производство ООО «Синтез-Ойл», Россия) и смеси неионогенных эмульгаторов (манитол моноолеат, Твин-80) с установленным соотношением компонентов (89:9:2), обеспечивающая формирование стабильных эмульсий обратного типа «вода в масле», при соотношении фаз антиген : адъювант 40:60.

Впервые установлено, что концентрация эмульгатора (фактор В) оказывает статистически значимое влияние на коллоидную стабильность эмульсии ($p < 0,05$), тогда как тип эмульгатора (фактор А) преимущественно определяет вязкостные характеристики эмульсии, что подтверждено методом дисперсионного анализа ANOVA и критерием Тьюки.

Впервые экспериментально доказана возможность полного импортозамещения французского адъюванта MontanideTMISA-70 (Seppic)

отечественной композицией без снижения иммуногенных свойств вакцины против высокопатогенного вируса гриппа птиц типа А подтипа H5N1

Теоретическая и практическая значимость работы, внедрение результатов исследования

Теоретическая значимость результатов исследования заключается в расширении научных знаний о механизмах формирования и стабилизации обратных эмульсий типа «вода в масле» на основе минеральных масел и неионогенных эмульгаторов; установлении количественных закономерностей влияния природы и концентрации компонентов адьювантной композиции на фармако-технологические свойства эмульсионных вакцин; развитии теоретических основ конструирования адьювантных композиций для инактивированных вакцин на основе отечественных минеральных масел и неионогенных эмульгаторов. Установлен адьювантный эффект разработанной масляной композиции на примере вакцины против высокопатогенного вируса гриппа птиц типа А подтипа H5N1, подтверждающий перспективность её использования в вакцинных препаратах.

Практическая значимость результатов исследования заключается в следующем: разработана технология масляных адьювантных композиций, формирующих обратный тип эмульсии, для производства безопасных, стабильных и высокоиммуногенных эмульсионных вакцинных препаратов против высокопатогенного гриппа птиц типа А подтипа H5N1 для парентерального введения. Впервые изучена стабильность при долгосрочном хранении и установлен срок годности (12 месяцев) инактивированной эмульсионной вакцины с разработанной адьювантной композицией при температуре $(5\pm 2)^{\circ}\text{C}$ и влажности $(60\pm 5)\%$. Создана рациональная технологическая схема производства инактивированной эмульсионной вакцины на основе разработанного масляного адьюванта. Достигнута импортонезависимость в процессе создания вакцины благодаря использованию отечественных компонентов (масло «Rajol», эмульгаторы),

что обеспечивает независимость от зарубежных поставок и снижает себестоимость производства вакцинных препаратов. Проведена фармакологическая оценка разработанного адьюванта, подтвердившая его эффективность (антителогенная активность состава №1 — $7,6 \log_2$) и безопасность (апирогенность, безвредность, слабая реактогенность) для использования в составе вакцинных препаратов. Разработан проект нормативной документации (ТУ) на инактивированную эмульсионную вакцину против гриппа птиц типа А подтипа H5N1 (на стадии согласования). В ходе выполнения данных исследований разработаны:

- лабораторный регламент на производство инактивированной эмульсионной вакцины против высокопатогенного гриппа птиц типа А подтипа H5N1;

- проект технических условий (ТУ) «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Инактивированная эмульсионная вакцина против высокопатогенного гриппа птиц типа А подтипа H5N1» (на стадии согласования).

На предприятии ФКП «Ставропольская биофабрика» проведены испытания разработанных адьювантных композиций. Получены Акты внедрения (акты о внедрении от 09.01.2024, 23.01.2024).

Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе в Пятигорском медико-фармацевтическом институте – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России на кафедре фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии в разделы дисциплин «Биотехнология» «Иммунобиотехнология. Производство вакцин», «Изготовление эмульсий». Подготовлен материал к лекционным и практическим занятиям для студентов 4 и 5 курсов (акт внедрения от 30.06.2025).

Методология и методы исследования

Методология разработки масляного адьюванта, состоящего из минеральных масел и неионогенных эмульгаторов, а также инактивированной эмульсионной вакцины на их основе, обоснована научной

концепцией, включающей взаимосвязанные теоретический, технологический, фармакологический и аналитический блоки, которые в полном объёме отражены в диссертационной работе.

В исследовании были использованы физико-химические, биотехнологические, технологические, биофармацевтические и аналитические методы, описанные в Государственной Фармакопее РФ XIV и XV изданий, Европейской фармакопее (2022 г.) и Фармакопее ЕАЭС (2022 г.). В работе использовались математические и статистические методы обработки данных при помощи пакета Microsoft Office Excel (версия 16.42) и программного обеспечения STATGRAPHICS Centurion XV (USA).

Работа была проведена на современном технологическом и аналитическом оборудовании, прошедшем аттестацию. Измерительные средства, используемые в исследованиях, имеют свидетельства о поверке.

Степень достоверности и апробация работы

Основные результаты и выводы диссертационной работы базируются на экспериментальных данных, выполненных и представленных в работе. Достоверность проведённых исследований подтверждена результатами лабораторных испытаний.

Основные положения диссертационной работы были доложены на Всероссийской научно-практической конференции «Молодые учёные в решении актуальных проблем науки» (8 - 10 декабря, 2022, г. Владикавказ), 76-ой и 77-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Во имя жизни и здоровья» (2022-2023, Пятигорск), IX международной научно-практической конференции «Биотехнология: взгляд в будущее» Россия» (30 марта 2023, Ставрополь, СтГМУ), Международной конференции «Фармацевтическая технология и её возможности в развитии фармацевтической промышленности» (26 апреля 2023г., Казахстан, г.Шымкент), ежегодной XXIX научно-практической конференция с международным участием «Интеграция новых технологий в

медицинскую науку и образование – основа современной подготовки кадров здравоохранения» (27 октября 2023 г., Душанбе).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Результаты анализа сведений из источников литературы, подтверждающих необходимость разработки отечественных масляных адьювантов.
2. Результаты изучения свойств минеральных масел и возможность их использования в составе масляного адьюванта при изготовлении противогриппозных вакцин.
3. Результаты изучения влияния природы и концентрации вспомогательных веществ на основные фармако-технологические и физико-химические свойства инактивированных эмульсионных вакцинных препаратов.
4. Технология масляных адьювантных композиций.
5. Результаты исследований по разработке инактивированной эмульсионной вакцины на основе полученных масляных адьювантов и изучения их стабильности.
6. Результаты изучения реактогенности, стимулирующих и эмульгирующих свойств разработанных масляных адьювантов отечественного производства.
7. Результаты исследований безвредности и эффективности полученных инактивированных эмульсионных вакцин.

Связь задач с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ Пятигорского медико-фармацевтического института — филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградского государственного медицинского университета» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Личный вклад автора

Все приведенные в диссертации данные были получены автором на базе Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России и на предприятии ФКП «Ставропольская биофабрика». Доля участия в объёме проведённой работы составляет не менее 90%.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности – 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам паспорта специальности:

2. Проектирование и разработка технологий получения фармацевтических субстанций и лекарственных форм, утилизация производственных отходов с учетом экологической направленности. Стандартизация и валидация процессов и методик, продуктов и материалов. Оптимизация организационных и технологических процессов при разработке и получении лекарственных средств.

3. Исследование биофармацевтических лекарственных средств, их дизайн и изучение фармацевтических факторов, влияющих на биодоступность. Разработка и валидация стабильности лекарственных средств.

Публикации материалов исследования

По теме диссертации имеется 14 научных работ, среди которых 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России и 1 статья в издании, включенном в международную базу Web of Science.

Объём и структура диссертации

Работа изложена на 182 страницах машинописного текста, содержит 58 таблиц и 36 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы исследования, четырёх глав экспериментальных исследований, заключения, приложений, списка цитируемой литературы, включающего 157 источников, из них 131 отечественных и 26 иностранных авторов.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Состояние рынка иммунобиологических препаратов

В России в настоящее время сложилась сложная ситуация на рынке химико-фармацевтических и иммунобиологических препаратов. Современное российское фармпроизводство испытывает существенную зависимость от импорта: по витаминам (из необходимых 14, в России производится только витамин К₃), аминокислотам (выпускается две - лизин и метионин); органическим кислотам - из большого перечня необходимых отрасли кислот в нашей стране производится - уксусная и молочная [66, 68, 101, 102, 113].

Ситуация на рынке вспомогательных веществ (эмульгаторы, растворители, стабилизаторы, адьюванты), используемых в производстве фармацевтических препаратов, обстоит примерно так же. К началу 2000х годов в России объемы данных субстанций упали более чем в 50 раз, а к 2014 году производство некоторых прекратилось вообще [3, 116].

Таким образом, многие отечественные предприятия производящие готовые лекарственные формы и профилактические средства используя импортные фармацевтические субстанции, стали отдавать предпочтение более дешевым из Китая и Индии или высококачественным европейским продуктам. Индия и Китай и в настоящее время являются основными мировыми площадками для выпуска фармацевтических субстанций [4].

В сегменте ветеринарных препаратов ситуация складывается аналогичным образом. До 85% вакцин, используемых в ветеринарии, имеют сегодня импортное происхождение. Проведенный Россельхознадзором анализ рынка вакцин для профилактики инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц показал, что основными зарубежными поставщиками являются четыре компании, имеющие производственные площадки в США, Франции, Мексике, Нидерландах и Испании [5, 110, 113, 129].

Неоспоримым преимуществом вакцин зарубежного производства всегда было высокое и стабильное качество. Все это привело к тому, что, к 2022 году до 70% вакцин, используемых в птицеводстве, имели импортное происхождение. Всего в России было зарегистрировано 297 импортных вакцин для животных, в том числе для птицеводства – 117. В настоящее время, согласно информации Россельхознадзора, доля импортных вакцин на российском рынке стала снижаться в связи с уходом иностранных производителей [64, 81,110].

Согласно данным таможенной статистики в 2022 году в Россию было импортировано 24,43 млрд. доз вакцин для птицеводства от 13 компаний: Phibro/Abic, Boehringer Ingelheim, Elanco, Hipra, Ceva, Biovac, Arkolabs, MSD, Bioveta, Zoetis, Biovet/Huvepharma, Biopharm, Komipharm [81].

Вакцины отечественного производства, в основном изготавливались с использованием импортных вспомогательных веществ, поставляемых Европейскими компаниями.

Однако на сегодняшний момент производство вакцин для сельскохозяйственных животных и птиц ощутимо затормозилось на фоне санкционных ограничений [64, 70, 110].

В связи с вышесказанным, серьёзной проблемой на пути импортозамещения явилось отсутствие конкурентных адъювантов, произведённых в России, для производства инактивированных вакцин. Сравнительные тесты вакцин, произведённых с различными адъювантами, в том числе отечественного производства, подтверждают глобальную лидирующую позицию продуктов серии Montanide™ ISA французской компании SEPPIC. Это самые дорогостоящие на рынке адъюванты (до 70% в структуре себестоимости инактивированных вакцин), в их состав входят минеральные масла в сочетании с поверхностно-активными веществами на масляной основе, которые обладают исключительными характеристиками и предназначены для использования в эмульсиях типа «вода в масле» (W/O), «масло в воде» (O/W) или «вода-в-масле-в-воде» (W/O/W) [116, 123].

Некоторые российские фармацевтические компании и НИИ занимаются разработками в данном направлении, но пока не достигли значительных успехов. Замена масляного адьюванта предполагает создание продукта с «нуля». При этом важно не только изготовить препарат, но и тщательно проверить его на безопасность и эффективность.

Таким образом, актуальность создания отечественных вакцин и адьювантов обусловлена современными реалиями складывающейся политико-экономической ситуации и потенциальными возможностями для импортонезависимости и импортозамещения препаратов импортного производства на отечественные аналоги для профилактики болезней животных и птиц.

1.1 Высокпатогенный птичий грипп H5N1

1.1.1 Эпидемиология высокпатогенного вируса гриппа птиц H5N1.

Источники и пути передачи инфекции

Птичий грипп H5N1 – одна из главных инфекционных угроз современности. Этот высокпатогенный вариант птичьего гриппа способный вызывать массовый падеж сельскохозяйственной птицы [9, 13, 16, 19, 122].

Одним из ключевых элементов критической инфраструктуры современного общества являются вопросы производственной безопасности. Уровень развития и благосостояния конкретного социума определяется, в том числе, количеством животного белка, потребляемого на душу населения. Согласно данным ФАО (Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН), оптимальное потребление белка составляет 90-100 г в сутки, из которых 60% должны составлять белки животного происхождения [141].

По данным Федеральной службы государственной статистики (Росстат) 30% от общего объёма животного белка приходится на мясо птицы.

Рассмотрение представленных статистических данных указывает на существенную долю в рационе потребления белка гражданами РФ, приходящуюся на птицу [67, 128].

С учётом высокой биологической доступности и относительно невысокой стоимости и короткого производственного цикла (6-8 недель для бройлеров) белок птицы становится незаменимым компонентом в обеспечении продовольственной безопасности страны. В связи с несомненной критической важностью поддержания данного вида производства мяса на высоком уровне, меры обеспечения биологической безопасности производства имеют стратегическое значение для национальной безопасности [12].

Однако активные меры борьбы, сопровождающиеся уничтожением сотен миллионов домашней птицы, вызывают огромные экономические потери [34, 45, 75].

По данным всемирной организации здравоохранения животных, экономические потери от вспышек высокопатогенного гриппа птиц в мире в период 2000-2024 превысила 30 млрд. долларов США [104, 119, 122].

Вспышки высоко вирулентного гриппа птиц типа А подтипа H5N1, начавшиеся в 2003 г. в Азии, к настоящему времени зарегистрированы в 63 странах, в том числе в России. По состоянию на 4 марта 2025 года в мире зарегистрировали 363 очага высокопатогенного гриппа птиц на предприятиях и 543 вспышки в дикой природе, в том числе 236 вспышек были на предприятиях и среди некоммерческой и дикой птицы. В России в 2022-2024 годах зарегистрировано более 100 вспышек высокопатогенного гриппа птиц, что привело к уничтожению 4,5 млн. голов домашней птицы и экономическим потерям свыше 3 млрд. рублей [8, 41, 77].

Кроме того, по данным Центра по контролю и профилактике заболеваний именно птичий грипп H5N1 называют одним из кандидатов инфекционного агента в появлении следующей пандемии. Многообразие вирусов зоонозного гриппа, которые уже вызывали случаи инфицирования

человека, требует укрепления эпиднадзора за вирусами гриппа, как в популяциях животных, так и среди людей [19].

Контакт с вирусами гриппа птиц, как правило, приводит к инфицированию людей с развитием заболевания разной степени тяжести: от легких гриппоподобных симптомов или воспаления глаз до тяжелых острых респираторных заболеваний и летального исхода. Степень тяжести заболевания зависит от вируса, вызвавшего инфекцию, и индивидуальных особенностей организма инфицированного человека. Летальность при заражении вирусами гриппа А подтипов (H5) у людей значительно выше, чем при заражении вирусами сезонного гриппа. Основным фактором риска инфицирования человека вирусами гриппа птиц является контакт с инфицированной живой или мертвой домашней птицей или объектами окружающей среды, на которых присутствует вирус [34, 73, 105, 106.]

Эффективной и экономически выгодной мерой по предотвращению и недопущению новых вспышек пандемии может стать тотальная вакцинация всего поголовья домашней птицы и иммунизация птицы в фермерских хозяйствах [17, 35, 39, 146, 147].

1.1.2 Профилактика и меры борьбы с птичьим гриппом H5N1

В настоящее время проблема зооантропонозов решается с помощью специально разработанных вакцин, которые служат мерой профилактики и обеспечивают надёжную защиту, как для животных, так и для человека [9, 39, 72, 77].

Для профилактики птичьего гриппа необходимо строго соблюдать ветеринарно-санитарные правила. Вакцины против птичьего гриппа у домашней птицы основаны на гене гемагглютинина (HA), а защита специфична для каждого серотипа. Универсальных вакцин пока не имеется, ведётся их разработка, большинство используемых на сегодняшний день вакцин основано на инаktivации всего вируса [24, 35, 112].

На сегодняшний день на российском рынке имеется ряд отечественных и зарубежных вакцинных препаратов против птичьего гриппа штамма H5N1, используемых для профилактики данного заболевания (табл. 1). Наибольшим спросом пользуются инактивированные эмульгированные вакцины производства ФКП «Ставропольская биофабрика» и ОАО «Покровского завода биопрепаратов». Данные препараты предназначены для профилактики гриппа у птиц всех видов в благополучных, угрожаемых и неблагополучных племенных, товарных, фермерских, личных и подсобных хозяйствах [94, 110, 147].

Таблица 1 – Отечественные и зарубежные вакцинные препараты, применяемые для профилактики и лечения птичьего гриппа штамма H5N1 в России

Название	Страна производитель	Фирма	Состав адьюванта
H5N1 Vaccine*	Россия	Микроген	Масло соевых бобов/ Монтанид ISA 70 (SEPPIC)
Совигрипп	Россия	Микроген	Совидон (сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона)
Авировак*	Россия	ФГБНУ ВНИВИП	Монтанид ISA 70 (SEPPIC)
АвиФлуВак*	Россия	ВНИИЗЖ	Медицинское белое масло / Монтанид ISA 70 (SEPPIC)
ФлуПротект H5*	Россия	ФКП «Ставропольская биофабрика»	Монтанид ISA 70 (SEPPIC)
AviPro	Германия	BoehringerIngelheim	Гидроксид алюминия (Al(OH) ₃)

1	2	3	4
Refluvac	США	Merck & Co., Inc.	Полиоксидоний
Panflu	Китай	Sinovac Biotech Ltd.	Минеральное масло, Монтанид, гидроксид алюминия
Vaxigrip	Франция	Sanofi Pasteur	Не содержит адъювантов
Fluarix	Бельгия	GlaxoSmithKline	Не содержит адъювантов
AgriFlu	Италия	Novartis VaccinesandDiagnos tics	Масляный адъювант MF59 (сквален + Твин-80)
Ativ	Италия	Novartis Vaccinesand Diagnostics	Масляный адъювант MF59 (сквален + Твин-80)
Fluad	Италия	Novartis Vaccinesand Diagnostics	Масляный адъювант MF59 (сквален + Твин-80)
Prepandrix	Великобритания	GlaxoSmithKline	Масляный адъювант AS03 (сквален, DL- α -токоферола ацетат, полисорбат 80)
Flublok Quadrivalent	США	Protein Sciences Corporation	Не содержит адъювантов
Inactivated Influenza Virus Vaccine (H5N1)	США	Sanofi Pasteur	Не содержит адъювантов
Nobilis Influenza H5N1	Нидерланды	Merck Animal Health	Монтанид
Avian Influenza Vaccine	США	Zoetis	Монтанид
Vaxsafe AI H5N1	Австралия	CSIRO Australian Animal Health Laboratory	Монтанид
FluVac H5N1	Китай	Huvepharma	Монтанид

1	2	3	4
H5N8 VACCINE	Южная Корея	Korea Animal Health Industry Association (KAHIA)	Монтанид
Avian Influenza Vaccine, Inactivated H5N1	Китай	Harbin Veterinary Research Institute	Монтанид

Примечание:


(*) – в настоящее время выпуск препарата ограничен или приостановлен

 Производят в России

 Закупаются зарубежом, в основном в недружественных государствах

 Закупаются в Китае

 Вакцины, которые не содержат масляных адъювантов

 Вакцины, содержащие масляные адъюванты, чаще всего монтаниды

Анализ ассортимента, вакцин против гриппа птиц, используемых в России, показал, что только 5 вакцин производят в России, от используемых вакцин. Остальные закупаются за рубежом, в основном в недружественных нам государствах. В качестве адъюванта в производстве данных вакцин в основном используются масляные адъюванты и только в производстве трёх вакцин используют прочие адъюванты. Глобальную лидирующую позицию среди адъювантов в инактивированных вакцинах российского и зарубежного производства занимают адъюванты Montanide™ ISA французской компании SEPPIC [58, 60].

В России также эмульсионную вакцину против вируса гриппа птиц производят на основе масляного адъюванта французской компании SEPPIC, поставки которого на сегодняшний день приостановлены на фоне санкционных ограничений[3, 16, 33, 51].

1.2 Адъюванты. Общая характеристика адъювантов. Классификация

Адъюванты – вещества, которые добавляют к вакцинным антигенам для усиления и модулирования их иммуногенности. Первые адъюванты

разрабатывались с целью повысить антительный ответ, и это единственное требование было достаточным. Однако благодаря прогрессу иммунологии и фармации, в настоящее время адьюванты помогли решить целый ряд более важных задач [1, 2, 6]. Признано, что применение адьювантов позволяет:

- обеспечить выраженный иммунный ответ, снижая при этом количество доз, необходимых для индукции протективного ответа;
- увеличить продолжительность специфического иммунного ответа;
- усилить ответ клеточных звеньев специфического иммунного ответа, таких как Т-клеточный ответ, являющийся ключевым фактором защиты от многих инфекционных заболеваний;
- расширить спектр иммунного ответа в отношении различных антигенов, обеспечивая более широкий перекрестный иммунитет;
- усилить иммунный ответ у слабо отвечающих пациентов (пожилых, у лиц с иммуносупрессией);
- обеспечить антигенсберегающую стратегию в производстве вакцин.

Использование адьювантов наиболее значимо для вакцин, содержащих инактивированные бактериальные токсины, очищенные субъединицы и рекомбинантные белки вирусов [50, 52, 103, 109, 118, 127].

В настоящее время единой классификации адьювантов не существует. Одним из ведущих российских специалистов в области вакцинации Н.В. Медуницыным предложена наиболее полная классификация адьювантов по их происхождению [74].

1. Минерально-солевые – коллоиды, растворимые соединения, кристаллоиды.
2. Сложные искусственные адьювантные системы – масляные адьюванты, липосомы, микрокапсулы и др.
3. Растительные – сапонины.
4. Микробные – корпускулярные и субъединичные структуры, белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы, липополисахаридобелковые комплексы.

5. Синтетические вещества, полинуклеотиды (поли-А, У; поли-И, Ц и др.), пептиды, гликопептиды.
6. Цитокины и пептиды со свойствами цитокинов [6, 74].

Минерально-солевые адъюванты. К этой группе относятся такие соединения, как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, квасцы алюмокалиевые. В этом случае антиген смешивают с гелеобразным адъювантом, на котором происходит его осаждение. При этом образуются так называемые сорбированные или преципитированные препараты, которые стимулируют преимущественно гуморальный иммунитет, действуя на вспомогательные клетки и лимфоциты Th2. Широкое применение в медицине и ветеринарии получили соединения алюминия. Антиген смешивают с гелями алюминия гидроксида, где происходит адсорбция посредством ионного взаимодействия. Соединения алюминия могут вызывать образование мелких гранулём, в которых удерживается адсорбированный антиген. Данные адъюванты приводят к активации фагоцитов и запуску некоторых воспалительных реакций. Гидроксид алюминия применяют в вакцинах АКДС, «Пентаксим», «Инфанрикс», противогриппозной вакцине «Орнифлю», пневмококковых вакцинах, вакцинах против гепатита В и некоторых антигемофильных вакцинах [56].

Более сложные адъюванты состоят из смесей масел или липополисахаридов с добавлением эмульгаторов, а также смесей масел с минеральными сорбентами [61, 76, 107].

Масляные адъюванты, как правило, изготавливают на основе высокоочищенных минеральных масел. Антиген, предварительно растворенный в воде диспергируется в масле. В результате капли воды с антигеном находятся в масляной фазе, то есть образуется эмульсия типа вода-масло. Для стабилизации эмульсии используют эмульгаторы, которые повышают дисперсность водных капель вакцины в масляной фазе и обеспечивают стабильность эмульсии. После распада эмульсии в результате ферментативного расщепления эмульгатора антиген медленно выделяется из

этих капель на протяжении нескольких лет, создавая длительный иммунный ответ [43, 49, 51, 53, 54, 91, 120, 123].

Среди адьювантов этой группы, наиболее востребован французский адьювант Montanide ISA-70 VG, который входит в состав таких вакцин от гриппа, как Авировак, АвиФлуВак, ФлуПротект H5 и др. (табл. 1).

Минерально-масляные адьюванты или полный адьювант Фрейнда представляют собой эмульсию адьюванта в масле, содержащую инактивированные микобактерией туберкулёза (*Mycobacterium tuberculosis* или *M. butyricum*).

По стимуляции образования антител полный адьювант Фрейнда не имеет себе равных. Однако применение его в терапевтических целях ограничено, так как может вызывать образование абсцесса вместе введения, острую боль, лихорадку, возможность повреждения органов [35, 96].

Липосомы - частицы, содержимое которых ограничено липидной мембраной, в последнее время стали использоваться при конструировании адьювантных композиций. В липосомах антиген может быть как на поверхности, так и внутри частицы. Гидрофильные антигены легко включаются во внутреннюю полость липосом, а гидрофобные – в фосфолипидную мембрану частиц. В настоящее время известны вакцины от гриппа на основе липосом – Inflexal и Eраxal [38, 46, 154].

Сапонины, используемые в качестве адьюванта, относятся к группе гликозидов и стабилизируют гидрофобные молекулы поверхностных вирусных белков. В этом случае образуются структуры, подобные пчелиным сотам, которые оказывают гораздо больший иммуностимулирующий эффект, чем результат действия вирусных белков. Вызывая повреждение тканей, способствуют задержке антигена в месте инъекции. Сапонины используются в составе вакцин Shingrix - против герпеса и Mosquirix для профилактики малярии. Совместно с холестерином и фосфолипидами они входят в состав адьюванта ISCOM (Швеция) [44].

Адьюванты на основе нуклеиновых кислот. К этой группе относится адьювант Magic TM Mouse (Creative Diagnostics, USA), который состоит из ДНК микобактерий и содержит большое количество CpG-мотивов. Они активируют врождённую иммунную систему через Toll-подобный рецептор 9 (TLR9). Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) и их синтетические аналоги считаются перспективными кандидатами на роль адьювантов для вакцин. [39, 57, 140, 152, 154]. Однако на текущий момент препараты на основе нуклеиновых кислот не применяются в клинической практике, так как технологии доставки генетического материала внутрь клетки организма ещё разрабатываются.

Сквален - усиливает иммунный ответ организма [18]. Сквален является компонентом адьюванта MF59, добавляемого в противогриппозную вакцину «FLUAD» (Италия) (табл.1).

Кроме того, в качестве адьювантов используются *синтетические адьюванты* (полимеры). Среди синтетических адьювантов можно выделить полиакрилаты (в рекомбинантной вакцине против классической чумы свиней), полистиренсульфонат (в вакцине Гриппол плюс, Совигрипп), модифицированный хитозан (в субъединичной вакцине из штамма вируса гриппа свиного происхождения (H1N1), полимеры молочной и гликолевой кислот (рекомбинантная противотуберкулёзная вакцина)[80].

Наночастицы – адьюванты – это вещества природного происхождения или синтезированные биоразлагаемые полимеры, имеющие размер от 1 нм до 100нм [108]. Одним из примеров использования наночастиц в качестве адьювантов, является вакцина NVX-CoV2373 от компании Novavax (USA) против COVID-19.

Таким образом, для создания противогриппозных вакцин, применяемых в птицеводстве РФ, использованы адьюванты неорганической природы, масляные адьюванты, сапонины, сквален и липосомы.

Однако большинство зарегистрированных в РФ вакцин для птицеводства, содержат масляные адьюванты [16, 33, 110, 111].

Эти препараты пользуются доверием у представителей ветеринарного сообщества и рекомендуются органами государственного ветеринарного контроля. Исследования показывают, что применение вакцин с масляными адьювантами позволяет сформировать напряженный иммунитет продолжительностью до 12 месяцев после однократного введения, что особенно важно для промышленного производства. Согласно исследованиям ВНИВИП (Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства), применение современных вакцин с масляными адьювантами позволяет снизить заболеваемость птиц на 95-98% и сократить экономические потери отрасли на 85-90% [16, 19, 51].

1.3 Масляные адьюванты. Монтаниды

Масляные адьюванты, в настоящее время являются самыми эффективными в борьбе с птичьим гриппом [1, 3, 15, 50,91].

История использования масляных эмульсий-адьювантов насчитывает около 100 лет, однако детальные механизмы действия открыты совсем недавно [1, 50]. Положительный эффект вакцинации масляными эмульсиями достигается за счёт того, что минеральное масло не метаболизируется, капли эмульсии с антигеном внутри удерживаются в месте введения длительное время, обеспечивая пролонгированный иммунный ответ:

1. Депо-эффект.

Минеральные масла создают локальное депо антигена в месте инъекции, обеспечивая его постепенное высвобождение в течение продолжительного периода времени. Это позволяет иммунной системе контактировать с антигеном дольше, что способствует формированию более сильного иммунного ответа [145]. Эмульсии типа вода-в-масле создают депо для антигена, из которого он медленно высвобождается, что продлевает его доступность для иммунной системы и усиливает иммунный ответ [136].

2. Стимуляция воспалительной реакции.

Минеральные масла вызывают контролируемую воспалительную реакцию вместе инъекции, что приводит к привлечению антиген-презентирующих клеток (АПК); активации врожденного иммунитета; усилению продукции провоспалительных цитокинов [54, 138].

3. Масляные адъюванты индуцируют воспаление в месте введения инъекции, которое привлекает и активирует дендритные клетки и макрофаги, это критически важно для инициации адаптивного иммунного ответа [62, 137, 142].

4. Улучшение презентации антигена.

Минеральные масла способствуют более эффективному захвату антигена антиген-презентирующими клетками и его представлению Т-лимфоцитам. Эмульсионные препараты на основе минеральных масел улучшают поглощение антигена АПК и последующую презентацию антигенных пептидов Т-клеткам, что приводит к увеличению как клеточного, так и гуморального иммунитета [63, 148].

5. Модуляция иммунного ответа.

Масляные адъюванты способствуют формированию определенного типа иммунного ответа. Они преимущественно стимулируют Th2-опосредованный иммунный ответ с повышенной продукцией антител, особенно IgG1 и IgE, что делает их более эффективными против внеклеточных патогенов [150].

6. Повышение аффинности антител.

Благодаря масляным адъювантам, длительное присутствие антигена способствует процессу созревания аффинности антител в зародышевых центрах, что приводит к выработке антител с более высокой аффинностью и, как следствие, более эффективной защитой [54, 55, 143].

Среди масляных адъювантов наибольшее распространение получили монтаниды. Масляные адъюванты Фрейнда названы так по имени автора, американского иммунолога Julius Freund (1890–1960). Они представляют собой эмульсию воды, в масле [54, 74]. Неполный адъювант Фрейнда (НАФ)

состоит из смеси 85% минерального масла «Magso1-52» и 15% моноолеата маннита. «Magso1-52» это вязкое, высокоочищенное медицинское белое масло, обладающее наивысшей степенью чистоты (наличие примесей менее 0,1%) (Paraffinum liquidum). Полный адъювант Фрейнда (ПАФ) состоит из НАФ, в который в качестве иммуностимулятора добавлены инактивированные микобактерии туберкулёза (*M. tuberculosis*). ПАФ и НАФ эффективно стимулируют клеточный иммунитет, а также значительно повышают интенсивность продукции антител [39, 139].

Для иммунизации обычно готовят эмульсию из 70% адъюванта Фрейнда и 30%-водного раствора антигена. Многие десятилетия адъюванты Фрейнда использовались только для экспериментальных исследований из-за нежелательных побочных явлений. Высокая степень очистки компонентов, а также использование масел, деградирующих в организме, позволили создать варианты НАФ, не вызывающие образования гранулём или каких-либо других нежелательных явлений [92, 95, 115].

Самыми популярными представителями этой группы адъювантов являются масляные адъюванты фирмы «Seppic» (Франция). Эти продукты снискали уважение и доверие у большинства производителей масляных вакцин благодаря устойчивым показателям при создании эмульсии и стабильным иммунным реакциям у целевых животных. Среди них наиболее востребован масляный адъювант марки Montanide ISA-70 VG (состоит из высокоочищенного медицинского минерального масла низкой вязкости и эмульгатора моноолеата манитола, а также не раскрываемых производителем специальных компонентов) [92].

Другим масляным адъювантом, применяемым в производстве вакцин, является адъювант MF 59. В его состав входит сквален, Твин-80 и триолеат сорбита в весовых соотношениях 17:1:1 соответственно. Адъювант MF 59 эмульгируют в водном растворе антигена. Получаемая эмульсия состоит из наночастиц масла в воде, размер частиц 200–300 нм. Однако данный

адъювант не получил широкого распространения и используется только в составе вакцин «Ativ» и «AgriFlu» (табл. 1).

Не смотря на имеющиеся преимущества масляных адъювантов, имеется ряд проблем при разработке технологии эмульсионных вакцин на их основе. В первую очередь необходимо устранение низкой антигенной и иммуногенной активности, а также совершенствование схем применения вакцинных препаратов. Эти проблемы являются актуальными для фармации, и ветеринарии и требуют дальнейших исследований и разработок [40, 93, 98, 127].

1.4 Проблема создания эмульсионных вакцин

Эффективность вакцины зависит не только от количества и качества антигена, но и от правильного выбора вспомогательных веществ, способствующих повышению иммунного потенциала вакцины. Одной из важных проблем, с которыми сталкиваются биофабрики и предприятия по производству вакцинных препаратов это отсутствие производства высокоочищенных белых масел в России [7, 55, 99, 100].

Как указывалось ранее, использование масляных адъювантов предполагает создание эмульсионных вакцин, в связи с этим важной технологической проблемой при конструировании вакцин, является нестабильность эмульсий. Это влияет на эффективность и безопасность вакцины. Если эмульсия разрушается, то антигены, включённые в её состав, быстро высвобождаются и разлагаются, что приводит к неэффективной вакцине [11, 62, 82].

Широкому использованию эмульсионных вакцин препятствует высокая вязкость и реактогенность, особенно при массовой обработке птиц [14,59, 65, 114].

Комплекс веществ, используемый для изготовления эмульсионных вакцин, способствует усилению иммунного ответа, но зачастую вызывает

нежелательные воспалительные реакции в месте введения препарата [37, 48, 127].

Несмотря на эти проблемы, масляные адъюванты представляют большой практический интерес благодаря значительному повышению иммуногенности вирусных вакцин и снижению затрат на вакцинопрофилактику. По данным Российского птицеводческого союза они составляют 3-5% от себестоимости продукции птицеводства, при этом предотвращенный экономический ущерб превышает затраты в 15-20 раз. Это делает вакцинацию с использованием современных адъювантных вакцин не только медицински обоснованной, но и экономически высокоэффективной мерой обеспечения продовольственной безопасности страны [8, 147].

1.5 Технологические аспекты создания эмульсионных вакцин

Большая часть современных противовирусных инактивированных эмульсионных вакцин для птиц представляют собой сложные многокомпонентные иммунобиологические препараты, состоящие из дисперсной фазы, представленной одним или несколькими инактивированными вирусами, в комбинации с масляным адъювантом. Масляный адъювант, содержащий в качестве основы высокоочищенное минеральное масло в сочетании с эмульгатором, имеет биполярные молекулы, в вакцине является дисперсной средой. Получение стабильной эмульсии из дисперсной среды и фазы осуществляют с помощью специальных гомогенизаторов [10, 11]. Тип эмульсии зависит от гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) эмульгатора (рис. 1).

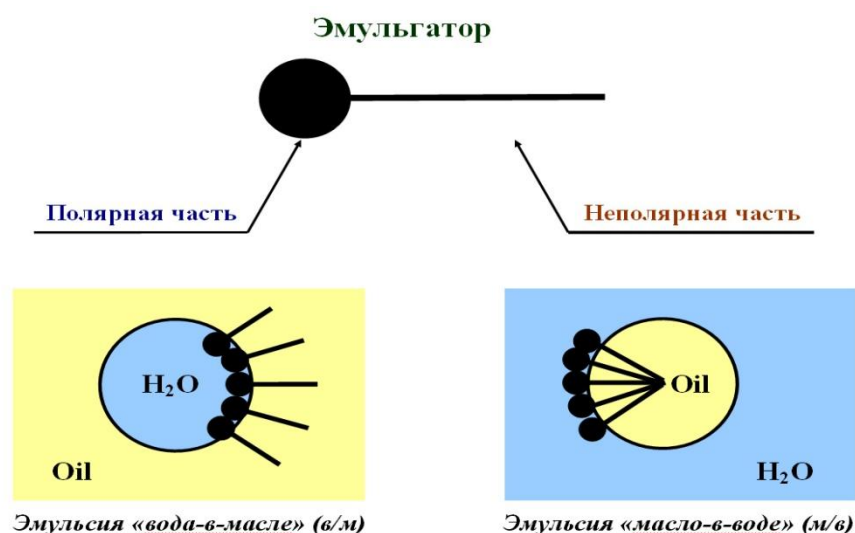


Рисунок 1 - Влияние эмульгатора на тип образовавшейся эмульсии

Эмульгаторы с ГЛБ от 4 до 8 применяют для эмульсий обратного типа («вода-масло»), которые широко используются в технологии изготовления инактивированных вакцин против вирусных болезней птиц [11].

1.5.1 Влияние состояния эмульсии обратного типа на иммунобиологические свойства инактивированных вакцин

В зависимости от способа изготовления, условий технологического процесса, хранения и транспортировки инактивированные вакцины с эмульсией обратного типа могут иметь различные физические состояния эмульсии, которые влияют на их иммунобиологические свойства. В эмульсиях типа «вода-масло» могут происходить как обратимые, так и необратимые физические изменения, связанные с технологическими процессами при изготовлении и хранении препарата. Вакцина с нормальной эмульсией характеризуется равномерным распределением однородных частиц дисперсной фазы по всему объему дисперсной среды вакцины и визуально выглядит как жидкость белого или слегка розового цвета [20, 69].

Одним из обратимых изменений физической структуры эмульсий является «креминг». Его отличительной особенностью «креминга» считается отделение в верхней части флакона слоя прозрачного масла высотой до 10-15

мм, при этом остальная масса вакцины представлена нормальной эмульсией. Явление креминга может наблюдаться в том случае, когда при производстве вакцины использовалось избыточное количество адьюванта (дисперсной среды). Для возвращения такой эмульсии к нормальному состоянию достаточно перед применением флакон с вакциной тщательно встряхнуть в течение 3-5 минут [10].

Часто встречаемое обратимое изменение эмульсионных систем, в котором вакцина разделена на две фракции: верхнюю, более жидкую и прозрачную, и более густую - нижнюю называется «ситтинг» [10, 12].

«Ситтинг» происходит из-за агрегации (флокуляции) отдельных частиц дисперсной фазы в более тяжелые конгломераты, которые образуются в нижней части флакона. Формирование нижней плотной фракции происходит при изготовлении вакцин с переизбытком инактивированного антигена (дисперсной фазы) или при нарушении температурных режимов во время хранения и транспортировки [12, 76].

Так как иммуногенная активность верхней и нижней фракций эмульсионной вакцины значительно различается между собой, данное состояние эмульсии является недопустимым в производстве вакцинных препаратов. В результате необратимого изменения эмульсии обратного типа у биологических препаратов происходит разрушение целостности водно-масляных частиц дисперсной фазы, при этом наблюдается отделение водной фракции, которая локализована в нижней части флакона с четкой линией раздела от верхней фракции, представленной водно-масляной эмульсией. Встречаются случаи, когда происходит разделение на три фракции: прозрачное масло, нормальная эмульсия и водная фаза в нижней части флакона. Данные изменения в целостности структуры водно-масляной эмульсии, могут происходить в результате использования эмульгаторов с низкой эмульгирующей способностью, а также как следствие негативного воздействия на вакцину низких или высоких температур [12, 109].

Эмульсионная вакцина с разрушенной структурой, непригодна для иммунизации птиц, так как не формирует у птиц «депо» инактивированного антигена и тем самым не индуцирует продолжительный иммунитет [49, 51].

Таким образом, технология производства эмульсионных вакцин оказывает значительное влияние на их технологические и иммунобиологические свойства. Выбор типа эмульсии и способа гомогенизации определяет стабильность препарата и интенсивность иммунного ответа. Технологические особенности эмульсионных вакцин, требуют строго контроля качества на всех этапах производства [39].

1.5.2 Факторы, влияющие на эффективность и функциональные свойства вакцин

Качество вакцинного препарата характеризуется главным образом его безопасностью и эффективностью, о которых судят по множеству показателей, определяемых физико-химическими, микробиологическими, иммунологическими, клиническими и иными методами [21, 39, 48].

1.5.2.1 Технологические факторы, влияющие на функциональные свойства эмульсионных вакцин

Размер частиц дисперсной фазы. Инактивированные вакцины, имеющие размер частиц эмульсии менее 1 мкм, как правило, обладают более высокой иммуногенной и антигенной активностью. Это связано с лучшей доступностью для макрофагов и последующей презентацией клеткам иммунной системы птиц [108, 153].

Влияние режимов и скорости гомогенизации (диспергирования) при конструировании эмульсионных вакцин. Наиболее частой ошибкой при получении эмульсий является неверный выбор интенсивности механического воздействия. Эмульгирование не всегда происходит лучше, если скорость

диспергирования выше. Существует оптимальная интенсивность механического воздействия, превышение которой приводит, как правило, не к образованию стабильной эмульсии, а чаще к расслоению и коалесценции. Связано это с тем, что устойчивые эмульсии получаются только в присутствии стабилизатора на поверхности капелек и выше определённой критической степени насыщения адсорбционного слоя, который препятствует слиянию частиц. Для образования адсорбционного слоя требуется определенный промежуток времени. В том случае, когда стабилизатор не успевает адсорбироваться на поверхности капель, при их столкновении происходит слияние. Таким образом, интенсивное перемешивание приводит к слиянию капель эмульсии, не успевших образовать адсорбционный слой [59, 117].

Кроме того, интенсивное диспергирование приводит к разрушению образовавшегося адсорбционного слоя и, следовательно, снижается потенциальный барьер коалесценции, в то время как кинетическая энергия капель растет [59, 69, 135].

Стабильность эмульсии. Длительное присутствие антигенных депо в лимфоидных органах, высвобождающих низкоуровневые антигены, стимулирует мощный иммунный ответ. Если эмульсия нестабильна и разрушается, то антигены быстро высвобождаются и разлагаются, что делает вакцину неэффективной [6, 13, 14].

Количество бактериального антигена в дозе вакцинного препарата. Избыточное количество антигена может вызывать угнетение иммунной системы организма и возникновение нежелательных реакций в месте введения препарата [16].

Состав масляных адъювантов. Недопустимо присутствие в их составе смол, так как это может вызвать местную воспалительную реакцию. Также нежелательны минеральные масла с кинематической вязкостью выше 200 мм²/с. [7, 69, 71, 79].

Наличие эмульгатора. Для стабилизации эмульсионных вакцин обязательно присутствие эмульгатора, в качестве которого часто применяют неионогенные поверхностно-активные вещества (Твин-80, моноолеат стеариновой кислоты, олеат ПЭГ) [1, 47].

Значение pH. При изготовлении вакцин желательно, чтобы значение pH находилось близко к нейтральному (около 7,0–7,6) для избегания раздражения в месте инъекции [98,109].

Стерильность. Вакцина должна быть стерильна [23, 84].

Эффективность иммунизации. Степень эффективности оценивается уровнем биологической защиты хозяйства, клиническим состоянием птицы, проведением регулярных серологических исследований привитых стад с использованием ИФА и РТГА и соблюдением методологии в исследованиях [45].

Таким образом, при разработке технологического процесса конструирования вакцины важно учитывать, чтобы все используемые материалы, методы обработки и режимы выполнения работ соответствовали действующим государственным стандартам. Это обеспечивает безопасность, качество и воспроизводимость продукции [23].

1.6 Статистическая обработка экспериментальных данных методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорного критерия Тьюки

Дисперсионный анализ (ANOVA) — это статистический метод, который используется для сравнения средних значений двух или более выборок. Он позволяет определить, различаются ли средние значения между группами, или же различия случайны. ANOVA используется в различных областях, включая науку, инженерию, медицину, социологию и многие другие, где необходимо доказать связь между переменными [155, 156].

ANOVA является мощным инструментом, который может использоваться в статистическом анализе для оценки влияния исследуемого фактора на зависимую переменную. Это помогает установить, является ли фактор значимым, и позволяет идентифицировать взаимодействие между переменными. ANOVA также позволяет определить, насколько сильно различия между группами, что может быть полезно при выборе стратегий манипулирования факторами [155, 157].

Апостериорный критерий Тьюки

Критерий Тьюки (критерий Тьюки-Крамера или HSD Тьюки) — это метод апостериорного анализа (post-hoc test), используемый после дисперсионного анализа (ANOVA). Он применяется для попарного сравнения средних значений нескольких групп, чтобы определить, между какими именно парами групп существуют статистически значимые различия [157].

Таким образом, представляет интерес использование данных методик для оценки экспериментальных данных для изучения стабильности эмульсии.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

На основе проведенного обзора литературы можно сформулировать следующие выводы:

1. Рынок иммунобиологических препаратов в России характеризуется высокой зависимостью от импорта, особенно в сегменте ветеринарных вакцин. До 85% вакцин для ветеринарии имеют импортное происхождение, что создает риски национальной продовольственной безопасности.

2. Птичий грипп H5N1 остается одной из главных инфекционных угроз современности, вызывающей значительные экономические потери в птицеводстве. В период 2022-2024 годов в России зарегистрировано более 100 вспышек, которые привели к уничтожению 4,5 миллион голов птицы и экономическим потерям свыше 3 миллиарда рублей.

3. Масляные адъюванты, особенно монтаниды, являются наиболее эффективными компонентами вакцин против птичьего гриппа. Они обеспечивают: депо-эффект антигена, стимуляцию воспалительной реакции, улучшение презентации антигена, модуляцию иммунного ответа.

4. Основными проблемами создания эмульсионных вакцин являются:

- Нестабильность эмульсий
- Высокая вязкость
- Реактогенность
- Сложность поддержания оптимальной структуры эмульсии

5. На эффективность вакцин влияют многие технологические факторы, включая:

- Размер частиц дисперсной фазы
- Режимы гомогенизации
- Стабильность эмульсии
- Состав масляных адъювантов
- Значение pH

- Стерильность препарата

6. Импортозамещение в сфере производства вакцин и адъювантов является критически важной задачей для обеспечения национальной безопасности и независимости агропромышленного комплекса России.

7. Требуется дальнейшее совершенствование технологий производства вакцин, разработка отечественных адъювантов и эмульсионных систем с улучшенными характеристиками.

8. Оценка влияния отдельных вспомогательных веществ на показатели стабильности вакцин может быть изучена с помощью математической модели ANOVA и апостериорного критерия Тьюки.

Заключение по обзору литературы

В последнее время в мировом экономическом сообществе наметилась центробежная динамика к значительному обособлению государств, граничащая с развязыванием торговых и военных конфликтов. В такой геополитической реалии защита критической инфраструктуры Российского общества является ключевой задачей государства и общества. Одним из структурных элементов этого процесса стала продовольственная безопасность, которая обеспечивается высокотехнологичным сельскохозяйственным производством, в котором вакцинация поголовья животных залог безопасности и экономической эффективности.

Таким образом, производство вакцин и их компонентов — это важная составляющая продовольственной безопасности России. Несмотря на имеющиеся сложности, связанные с производством отечественных ингредиентов для создания масляных адъювантов вакцин исследования по созданию НАФ с высокой долей отечественных компонентов, остаётся актуальной задачей современной фармацевтической технологии РФ.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнялась на кафедре фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии ПМФИ, а также в лабораториях R&D сектора ФКП «Ставропольская биофабрика». При проведении экспериментальных и научно-производственных исследований строго выполнялись требования, которые предъявляются к экспериментам, такие как постановка контроля, соблюдение одинаковых условий эксперимента в период работы и учета результатов.

2.1 Материалы исследования

2.1.1 Биологические объекты исследования при конструировании эмульсионных вакцин

Антиген. Вирусный клеточный отлив гриппа А штамма H5N1 инактивированный 1% формалином, полученный на базе ФКП «Ставропольская биофабрика». Раствор асептически изготовленный, представлял собой опалесцирующую жидкость от светло-бежевого до розоватого цвета.

Подопытные животные.

Белые мышлинии ICR (CD-1) массой 18-20 г, для контроля реактогенности масел и масляного адьюванта.

Кролики (Термносский белый) массой 2,0-2,5 кг, для определения пирогенности вакцин.

Куры. В лабораторных экспериментах в условиях «Ставропольской биофабрики» было вакцинировано более 500 голов птиц в возрасте от 8 до 100 суток яичных кроссов «Хайсекс Браун» и «Хайсекс Белый», а также

цыплят, выращенных в лабораторных условиях «Ставропольской биофабрики».

2.1.2 Вспомогательные вещества, эмульгаторы, растворители

Для создания инактивированной эмульсионной вакцины в работе использовали вспомогательные вещества, представленные в таблицах 2-3

Таблица 2 - Минеральные масла, используемые в работе

№	Масло	Описание. Характеристики
1.	Масло базовое SN-80	Бесцветное, прозрачное. Кинематическая вязкость 2,8-3,5 мм ² /с
2.	Масло вазелиновое МХ-150 (Сертифицировано организацией NSF и имеет пищевой допуск Н1).	Светлая маслянистая прозрачная нефлуоресцирующая жидкость без запаха. Не содержит органических примесей и их производных, не имеет вкуса, цвета и запаха. Кинематическая вязкость 11-20 мм ² /с [125].
3.	Масло вазелиновое МГД-9 (гидрированное белое масло)	Гидрированное белое масло. Прозрачная бесцветная жидкость, не имеет запаха и вкуса, микробиологически и химически стабильное. Кинематическая вязкость 28-35 мм ² /с (ТУ 0253-286-05742749-99).
4.	Минеральное базовое масло Янос	Минеральное масло, бесцветное, без запаха, без вкуса, микробиологически и химически стабильное. Кинематическая вязкость 4-7 мм ² /с. (СТО 00149765-017-2022)
5.	Минеральное масло Rajol	Высокоочищенное минеральное масло/жидкий парафин, состоящее из насыщенных алифатических и алициклических неполярных углеводородов. Гидрофобное, бесцветное, без запаха и вкуса, маслянистая, вязкая жидкость. Кинематическая вязкость 7-15 мм ² /с. (Соответствуют требованиям US FDA 21 CFR 172. 878 и USFDA 21 CFR 178.3620 (a))
6.	Mobil Marcol 52 (Еххон Mobil)	Минеральное белое масло, бесцветное, без запаха, без вкуса. Кинематическая вязкость 8 мм ² /с. CAS number: 8042-47-5 соответствующее ENISO 9000

В диссертационной работе использованы эмульгаторы и стабилизаторы, разрешенные к применению в медицинской практике и пищевой промышленности, соответствующей квалификации, представленные в таблице 3.

Таблица 3 – Эмульгаторы и стабилизаторы, используемые в работе

Эмульгаторы/стабилизаторы		Нормативный документ
1.	Манитол моноолеат	ТУ-20.14.33-050-02816622-2024
2.	Моноолеат стеариновой кислоты	RU.77.99.21.008.E.033469.08.11
3.	Олеат ПЭГ-400	ТУ 9154-014-00333865-04
4.	Олеат ПЭГ-200	ТУ 20.16.40-255-05766801-2022
5.	Сорбитан олеат	ГОСТ Р ИСО 22000-2019 (ISO 22000:2018) Сертификат №ST.RU.0001.M0024397
6.	Твин-80	ТР ТС 029/2012
7.	Твин-20	ТР ТС 029/2012
8.	Аэросил	ГОСТ 14922-77
9.	Ланолин	RU.77.01.34.001.E.016581.10.11
10.	Наноалмазы	УДМ-ВК (ТУ-19386389-001-2022
11.	ТЭА	ТУ 2423-005-78722668-2010
12.	Сорбитан стеарат	ФС 6620.1
13.	Глицерил олеат	ТУ 9154-018-00333865-2013
14.	Диэтиленгликоль моноолеат	ГОСТ 10136-2019
15.	Триэтиленгликоль моноолеат	ТУ 20.14.33-032-00333865-2018
16.	Ламесофт	PRD 30747405
17.	Планта М	Органик-сертификация: ECOCERT
18.	Монтанид	190396-06-6

2.1.3 Используемое оборудование

Для проведения научных исследований использовали оборудование, представленное в таблице 4:

Таблица 4 –Лабораторная посуда и приборы

Наименование и технические характеристики	Завод изготовитель
1	2
Лабораторная посуда и расходные материалы	
Пипетки, 1, 2, 4, 10 мл	ЭКРОС-ХИМ
Пробирки (10 шт. на каждую пробу и контроль)	ЭКРОС-ХИМ
Подставки для пробирок	ЭКРОС-ХИМ
Стерильные флаконы на 50 и 100 мл с завинчивающимися пробками	ЭКРОС-ХИМ
Флаконы с дезинфицирующим раствором для использованных пипеток	ЭКРОС-ХИМ
Шпатель	ЭКРОС-ХИМ
Цилиндр	ЭКРОС-ХИМ
Воронка стеклянная	ЭКРОС-ХИМ
Пробирка стеклодрота на 10 мл	ЭКРОС-ХИМ
Весоизмерительные материалы	
Весы аналитические Demcom DA-224 (1 класса точности)	DEMCOM (Италия)
Весы DL-63 – лабораторные (2 класса точности)	DEMCOM (Италия)
Оборудование	
Верхнеприводная мешалка STEGLER MB-6	STEGLER (Китай)
Гомогенизатор DG-360 (1000-23000об/мин, 360Вт)	STEGLER (Китай)

<i>Продолжение таблицы 4</i>	
1	2
Гомогенизатор Megatron MT 3100 S2	Kinematica (Швейцария)
pH-метр HANNA HI 2210	
Ламинарный бокс односторонний БАВ - "Ламинар-С"	
Микроскоп Альтами БИО	
Холодильник бытовой Electrolux	
Вискозиметр типа ВНЖ, ГОСТ 10028	Labtex(со свидетельством о проверке)
Водяная баня с температурой нагрева 56°C;	
Секундомер	
Груша резиновая	
Резиновая трубка на вискозиметр	
Стерилизатор паровой Автоклав ВК-30	ОАО "Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов
Стерилизатор вакуумный	Россия
Шприцевой фильтр, с нейлоновой мембраной, поры 0,22 мкм, диаметр 33 мм, стерильный	Merck (Millipore Sigma- Aldrich, Supelco)
Лазерный анализатор частиц «Ласка– ТД»	(ООО «БиоМедСистем»)

2.2 Методы исследования

При изготовлении эмульсионной вакцины, использовались физические, физико-химические, фармацевтико-технологические, биотехнологические, иммунологические и статистические методы.

2.2.1 Методики определения физико-химических, технологических и иммунологических параметров минеральных масел

Плотность. Определение проводили согласно стандартной методике ГОСТ 3900, ГОСТ 51069 и ОФС «Плотность» с помощью пикнометра. Масло перед проведением эксперимента нагревали до 50°C, с целью понижения вязкости [28, 29, 83].

Температура застывания. Определяли по ОФС.1.2.1.0012.15 «Температура затвердевания». Измерение выполняли в приборе, в сухую внутреннюю пробирку прибора помещали испытуемое масло, а затем внутреннюю пробирку с маслом помещали во внешнюю пробирку. Быстро охлаждали и определяли приблизительную температуру затвердевания. После этого внешнюю пробирку вместе с внутренней помещали на водяную баню с температурой на 5°C выше приблизительно определенной температуры затвердевания до полного расплавления испытуемого масла. Затем заполняли стакан водой с температурой на 5°C ниже ожидаемой температуры затвердевания. Внешнюю пробирку вместе с внутренней помещали в стакан. При постоянном перемешивании испытуемого масла отмечали температуру каждые 30 секунд. Температуру, которая оставалась некоторое время постоянной, принимали за температуру затвердевания [88].

Вязкость. Определение проводили согласно ГОСТ 33-2016, ГОСТ 19296258 и ОФС.1.2.1.0015 «Вязкость». Измерение выполняли на

вискозиметре ВПЖ-2 с диаметром капилляра 0,99 мм, номинальным значением K 0,1 мм²/с. [26, 89].

Кислотное число. Определение проводили в соответствии со стандартной методикой определения кислотного числа «ОФС 1.2.3.0004.15 Кислотное число» и по ГОСТ 5985, 11362 [11-13]. Навеску исследуемого масла, помещали в колбу с обратным холодильником и растворяли в 50 мл смеси равных объемов спирта 96 % и эфира, предварительно нейтрализованных 0,1 М раствором натрия гидроксида в присутствии 0,5 мл фенолфталеина раствора 1 %. Титровали натрия гидроксида раствором 0,1 М до появления исчезающего бледно-розового цвета [30,85].

Реактогенность масел

Определение реактогенности масел проводили на кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии, под руководством д.ф.н. Позднякова Д.И., а также в лабораториях R&D сектора ФКП «Ставропольская биофабрика», совместно с ведущим научным сотрудником Лиховцевой Н.Е., на лабораторных животных, по методу Гарцета в модификации Е.В. Гусевой и А.И. Дудникова [25, 121, 127]. Использовали белых мышей массой 18-20 г, которым в подушечку задней правой лапы вводили испытуемое масло в объеме 0,05 см³, а в подушечку левой задней лапы эталонный образец Marcol-52 в том же объеме для контроля. После введения масла через 10 суток, предварительно усыпленным животным ампутировали задние лапы по голеностопному суставу и взвешивали на весах. Каждый образец испытуемого масла исследовали на 10 мышах. Критерием оценки реактогенности (K_p , %) – считали изменение массы лап после инъекции испытуемых образцов относительно массы лап после инъекции контрольного образца. Определяли коэффициент реактогенности по формуле:

$$K_p = \frac{X_0 - X_k}{X_k} 100\% \quad (1)$$

где x_k и x_0 – средние арифметические массы лап после введения контрольного и испытуемого образцов масел, соответственно.

2.2.2 Технология получения модельных образцов эмульсионных вакцин

Подбор параметров технологических процессов проводили экспериментально, основываясь на данные литературы и рекомендации производителей вакцинных препаратов.

2.2.2.1 Методы получения масляных адьювантов

Изготовление масляных адьювантов реализовывалось в условиях, обеспечивающих высокую степень чистоты, стабильность, стерильность, точную дозировку в соответствии с правилами GMP, на базе лаборатории R&D сектора ФКП «Ставропольской биофабрики», в зоне ламинарного потока, где создавалось небольшое избыточное давление. Масляные адьюванты получали при смешивании минеральных белых масел и эмульгаторов [124]. К маслу добавляли 2-11% эмульгатора. Диспергирование и смешивание проводили на водяной бане при помощи пропеллерной мешалки с ручным приводом и гомогенизатора DG-360. Полученный раствор подвергали стерилизации в вакуумном стерилизаторе при температуре 120° С – 40 минут, а также используя стерилизующую фильтрацию с помощью шприцевого фильтра с нейлоновой мембраной фирмы Merck (Millipore Sigma-Aldrich, Supelco) [130-133].

2.2.2.2 Методы получения инактивированной эмульсионной вакцины

Для изготовления опытных образцов эмульсионной вакцины использовали вирусный отлив высокопатогенного гриппа типа А подтипа H5

инактивированный формалином, полученный в условиях ФКП «Ставропольская биофабрика». Раствор асептически изготовленный, представлял собой опалесцирующую жидкость от светло-бежевого до розоватого цвета. Допустимо наличие мелких хлопьевидных образований.

При приготовлении опытных образцов вакцин активный компонент (антиген) объединяли с масляным адьювантом и эмульгировали на высокоскоростном лабораторном гомогенизаторе погружного типа DG-360и проточного типа Megatron MT 3100 S2. Полученную вакцину расфасовывали во флаконы.

Образцы готовили в соотношении антиген-адьювант - 20:80, 30:70, 40:60 и 50:50 [131, 133].

Для определения наиболее оптимальных условий гомогенизации вакцины, изменяли параметры времени и скорости перемешивания. К адьюванту добавляли водную фазу (вирусный отлив) при скорости перемешивания 1000 об. /мин., и увеличивали скорость вращения винта до 8000 об. /мин., гомогенизируя от 5 до 40 минут для получения однородной эмульсии белого цвета.

Методики определения типа эмульсии

Капельный метод. В воду отмеряли несколько капель исследуемой эмульсионной вакцины и, исходя из следующих критериев, определяли тип эмульсии:

- капли исследуемой эмульсии полностью растворяются в воде – тип эмульсии «масло-вода»;
- капли исследуемой эмульсии частично растворяются в воде – тип эмульсии «вода-масло-вода»;
- капли не растворяются в воде, а плавают в виде отдельных масляных капель на поверхности – тип эмульсии «вода-масло».

Метод определения непрерывной фазы (метод окраски): дисперсионная среда окрашивается краской, растворимой либо в воде, либо в масле. В качестве красителей были использованы: метиленовый синий и фуксин. На

каплю испытуемой эмульсии наносили крупинку красителя, растворимого в воде, (метиленового синего), или в неводных растворителях (фуксин) и наблюдали под микроскопом. Под микроскопом наблюдали окрашивание либо капелек фазы, либо дисперсионной среды [69, 117].

2.2.3 Методы контроля качества инактивированной эмульсионной вакцины

Описание. Определение проводили визуально. Для определения внешнего вида, наличия посторонних примесей, трещин, флаконы с вакциной просматривали в проходящем свете при взбалтывании, переворачивая пробкой вниз, одновременно проверяя прочность укупорки. По внешнему виду образцы вакцины должны соответствовать требованиям ГОСТ 33821-2016 «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульгированная» [27].

Стерильность. Образцы должны быть стерильны и соответствовать ОФС 1.2.4.003.15 «Стерильность» и ГОСТ28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности [23, 84].

Определение стерильности проводили методом посева на питательные среды (МПА, МПБ, Сабуро-агар, жидкая тиогликолиевая среда). Для инкубации посевов на питательных средах для бактерий стандартной температурой являлась $(32,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$, для грибов – $(22,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$.

Стабильность. Из пяти флаконов с вакциной после интенсивного взбалтывания отбирали по 10 см^3 и готовили объединенную пробу. Из объединенной пробы отбирали по 10 см^3 и вносили в три центрифужные пробирки. Пробирки с эмульсией центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин. После этого линейкой измеряли высоту столба прозрачной фракции в верхней части пробирки. Также оценивали стабильность двухнедельной выдержкой в термостате при 37°C . Испытание проводили в

соответствии с ГОСТ 33821-2016 «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульгированная» и ГОСТ 29188.3-91 «Изделия косметические. Методы определения стабильности эмульсии» [24, 27].

Кинематическую вязкость измеряли капиллярным вискозиметром ВПЖ-2 и выражали в мм²/с. Определение вязкости проводили согласно ОФС.1.2.1.0015 «Вязкость» и ГОСТ 33821-2016 «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульгированная. Технические условия» [26, 89].

Размер частиц. Определение проводили на лазерном анализаторе размера частиц «Ласка-ТД» методом малоуглового светорассеивания согласно ОФС.1.4.2.0028 «Размер частиц (капель) и их распределение по размерам в эмульсиях для парентерального применения» [90, 97, 126].

Определение концентрации водородных ионов (рН).

Определение проводили согласно ГФ 15 ОФС.1.2.1.0004 «Ионометрия», с помощью рН-метра Consort, в трёх повторностях при постоянной температуре 20°С согласно инструкции прибора. Значение рН устанавливали по трем измерениям, выводя среднее значение. Допускаемые расхождения между результатами не превышали 0,1 единицы.

2.2.4 Методы фармакологических исследований

Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 г. № 51) и с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Фармакологические исследования проводили совместно с ведущим научным сотрудником Ставропольской биофабрики Лиховцевой Е.Н. на базе Ставропольской биофабрики.

Безвредность вакцины определяли на лабораторных и естественно восприимчивых животных, путём введения двукратной дозы объемом 0,5см³. Вакцину считали безвредной, если все цыплята в течение 14 суток оставались живыми, без клинических признаков болезни. При вскрытии птицы на месте введения вакцины не должно быть выраженной воспалительной реакции [25, 27, 41].

Реактогенность вакцины определяли на лабораторных животных, образцы вакцины вводили в терапевтической дозе. Оценивали постпрививочную реакцию и степень осложнения, проявляющиеся в повреждении тканей. Наблюдение за животными проводили после вакцинации в течение 21 суток, проводя ежедневную оценку клинического состояния и наличие тканевых реакций в месте введения препарата, путем измерения длины, ширины, высоты олеогранулемы [13, 25].

Объем отека рассчитывали по формуле:

$$V = l \cdot b \cdot h \quad (II)$$

где l – длина, b – ширина, h – высота.

Антигенность вакцины оценивали по уровню образования специфических антител в крови иммунизированных животных. Постановку серологических реакций и учёт результатов проводили по общепринятым методикам гемагглютинации [25, 27]. Для проведения испытаний использовали 20 цыплят 8-10 дневного возраста. Вакцину вводили 10 цыплятам, 10 цыплят оставались невакцинированными (контроль). До вакцинации от цыплят получали сыворотку крови, которую исследовали одновременно с сыворотками, отобранными через 21—28 суток после вакцинации.

Пробы сыворотки крови, отобранные до и через 21—28 суток после иммунизации от цыплят опытной и контрольной групп, исследовали в

реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с вирусом гриппа типа А подтипа Н5, используя 1 % взвесь эритроцитов петуха или иммуноферментный анализ (ИФА).

Пирогенность вакцины проводили на кроликах массой 2,0-2,5 кг с исходной температурой 38,5 °С - 39,5 °С. У каждого кролика дважды измеряли температуру тела перед опытом, с интервалом не менее 30 минут. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не должны превышать 0,2 °С. Раствор испытуемого лекарственного средства вводили животным сразу после второго измерения температуры.

Измерения температуры после подкожного введения испытуемого лекарственного средства проводили с интервалом не более 30 минут на протяжении пяти часов согласно ОФС 1.2.4.00015.15. Пирогенность [87].

2.3 Математические методы анализа, используемые для обработки экспериментальных данных

Для обработки полученных данных после проведения экспериментов были использованы математический метод дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорный критерий Тьюки [157].

Экспериментальные данные загружались в интерфейс программы STATGRAPHICS Centurion XV (USA).

Для оценки данных с признаками нормального распределения был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), предназначенный для сравнения нескольких выборок (групп) и вычисления общего уровня значимости различий. Вывод по результатам ANOVA касается общего различия всех сравниваемых средних без конкретизации, какие именно выборки различаются. Для идентификации пар выборок, отличающихся друг от друга средними значениями, используются апостериорные критерии парных сравнений (Post Hoc). В данной работе применяли апостериорный критерий Тьюки - критерий подлинной

значимости (Honestly Significant Difference, HSD), как наиболее распространенный и рекомендуемый в литературе тест [157]. Различия были определены при 0,05 уровне значимости.

Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения STATGRAPHICS Centurion XV (USA).

2.3.1 Статистическая обработка результатов исследований

Для статистической обработки результатов исследований использовали программу Microsoft Excel в соответствии с ФЕАЭС, 2.3.13.0 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний», ГФ РФ, ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» и ФЕАЭС, 2.3.12.0 «Статистическая обработка результатов биологических испытаний лекарственных средств», ГФ РФ, ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» [86].

2.4 Дизайн исследования

Дизайн проведенных исследований по поиску и реализации перспективных адъювантных технологий в процессе создания эмульсионной вакцины против птичьего гриппа типа А подтипа H5N1 представлен на рисунке 2. Предварительный этап исследований включает изучение литературного обзора и патентный поиск, изучение физико-химических свойств минеральных масел и эмульгаторов, как основных компонентов масляных адъювантов. На следующем этапе исследований были определены критерии подбора минеральных и синтетических масел и неионогенных эмульгаторов по физическим, химическим и биологическим свойствам.

Разработан состав и технология новых масляных адъювантов. Изучены их реактогенные свойства на лабораторных и сельскохозяйственных животных. Следующий этап исследований включал разработку состава и технологию инактивированной эмульсионной вакцины на основе новых прописей масляных адъювантов. Изучены физические, технологические (вязкость, стабильность, размер частиц, стерильность) и иммуногенные свойства эмульсионных вакцин типа «вода — масло» (рис 2).



Рисунок 2 – Этапы фармацевтической разработки инактивированной эмульсионной вакцины против птичьего гриппа H5N1

Таким образом, предложенный нами дизайн исследования предполагает следующую последовательность действий при проведении опытов обеспечивающий реализацию матрицы завершеного цикла научно-

практических исследований по созданию рецептуры, технологии и НТД вакцины против гриппа птиц:

1. Техническая возможность создания однородной смеси минерального масла и эмульгаторов.
2. Способность полученного масляного адьюванта образовывать с раствором вирусного отлива стабильную эмульсию типа В/М в строгом ограниченном диапазоне вязкости.
3. Обеспечение долгосрочного выраженного и безопасного иммунологического ответа в целевых животных на введение исследуемой вакцины.

ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ МАСЛЯНОГО АДЬЮВАНТА ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ЭМУЛЬСИОННОЙ ВАКЦИНЫ

Повысить качество и стабильность эмульсионных препаратов можно путем совершенствования технологии и использования научно обоснованных вспомогательных веществ [69, 117, 124]. Инактивированную вакцину, представляющую собой эмульсию обратного типа, изготавливали на основе различных минеральных масел и эмульгаторов. Факторы способные оказывать значительное влияние на качество эмульсионного препарата, представлены в виде схемы на рисунке 3.



Рисунок 3 – Параметры, определяющие стабильность и характеристики эмульсии

Выявление основных технологических закономерностей конструирования эмульсий, стабилизированных смесью эмульгаторов различной природы, послужило целью наших дальнейших исследований.

Одним из основополагающих посылов к началу исследования была необходимость импортозамещения критически важного ингредиента для создания вакцин от гриппа типа H5N1 - масляного адьюванта.

Так как до начала СВО основным поставщиком масляных адьювантов была компания Seppic (Франция), масляный адьювант Montanide ISA-70W был выбран в качестве референтного образца по параметрам:

- техническая спецификация (описание);
- основные параметры технологии готового продукта;
- безопасность и эффективность.

Для оценки возможного влияния минерального масла и эмульгаторов на критические показатели качества, а также на технологический процесс разрабатываемой эмульсии было проведено предварительное исследование их фармако-технологических и физико-химических свойств.

3.1 Выбор эмульгаторов

Наиболее широко для формирования долговременного иммунитета при иммунизации сельскохозяйственных животных используется эмульсия обратного типа «вода – масло» [10, 51, 58]. Для изготовления эмульсионных вакцин данного типа суспендированный или растворенный в воде антиген диспергировали в масляном адьюванте в соотношении 30:70, в результате чего капельки воды с антигеном находились в масляной фазе.

Для стабилизации эмульсии в качестве эмульгаторов часто применяют неионогенные ПАВ [31, 51].

При конструировании масляных адьювантов, в своей работе мы использовали эмульгаторы, описанные в Главе 2 раздел 2.1.2, составы адьювантных композиций представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Составы адьювантных композиций

Компоненты	Составы адьювантных композиций																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Глицерол олеат	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Манитол моноолеат	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Олеат ПЭГ-400	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Олеат ПЭГ-200	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Сорбитан олеат	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Твин-80	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Твин-20	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Аэосил	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ланолин	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Наноалмазы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ТЭА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Сорбитан старарат	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Моноолеат стеариновой кислоты	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Диэтиленгликоль моноолеат	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Триэтиленгликоль моноолеат	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Ламесофт	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Планта М	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Монтанид	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Масло Marcol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Референтный образец

- Стабильные сразу после диспергирования и гомогенизации
- Расслоились в первые сутки после диспергирования и гомогенизации
- Расслоились после центрифугирования
- В состоянии «ситтинг» - гравитационное разделение на две фракции после центрифугирования

3.1.1 Оценка возможности получения эмульсии, отвечающей требованиям ОФС.1.4.1.0017

При изготовлении вакцинного препарата, представляющего собой эмульсию обратного типа, необходимым условием было равномерное распределение однородных частиц дисперсной фазы, содержащей антиген, по всему объему дисперсионной среды. Внешний вид эмульсии был основным определяющим фактором в технологии эмульсионных вакцин. Он зависит от технологических характеристик эмульсии: вязкость, стабильность, что, в дальнейшем на этапе фармацевтической разработки влияет на выбор оптимального состава и технологии, и может оказывать влияние на качество готовой вакцины [1, 14, 95].

Изготовление эмульсии проводили в условиях Ставропольской биофабрики, в стерильных помещениях класса чистоты А, в зоне ламинарного покрытия, используя в качестве гидрофильной дисперсной фазы вирусный отлив гриппа птиц штамма H5N1 инактивированный формалином. В лабораторных условиях кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии ПМФИ, в качестве гидрофильной дисперсной фазы при изготовлении эмульсии была использована вода очищенная стерильная. Конструирование эмульсии проводили в соответствии с методикой, описанной в главе 2 в разделе 2.2.2.2.

Полученные эмульсии имели вид однородной жидкости белого или розоватого оттенка цвета (рис. 4).



Рисунок 4 - Эмульсия обратного типа

Оценку внешнего вида полученных образцов проводили в три этапа:

1. Сразу после диспергирования и гомогенизации.
2. После центрифугирования в течение 30 минут.
3. Спустя 10 суток хранения при $t (5\pm 2) ^\circ\text{C}$

Первым этапом контроля результатов технологических экспериментов было визуальное наблюдение по окончании процесса диспергирования, результаты представлены на рисунках 5 - 6.



Рисунок 5 – Образцы эмульсии, соответствующие требованию ОФС «Эмульсии» по показателю внешний вид

Образцы под номерами 1, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 14 по внешнему виду представляли собой однородную эмульсию белого или бело-розового цвета. При хранении наблюдалось незначительное расслоение эмульсии, однако при взбалтывании однородность восстанавливалась.

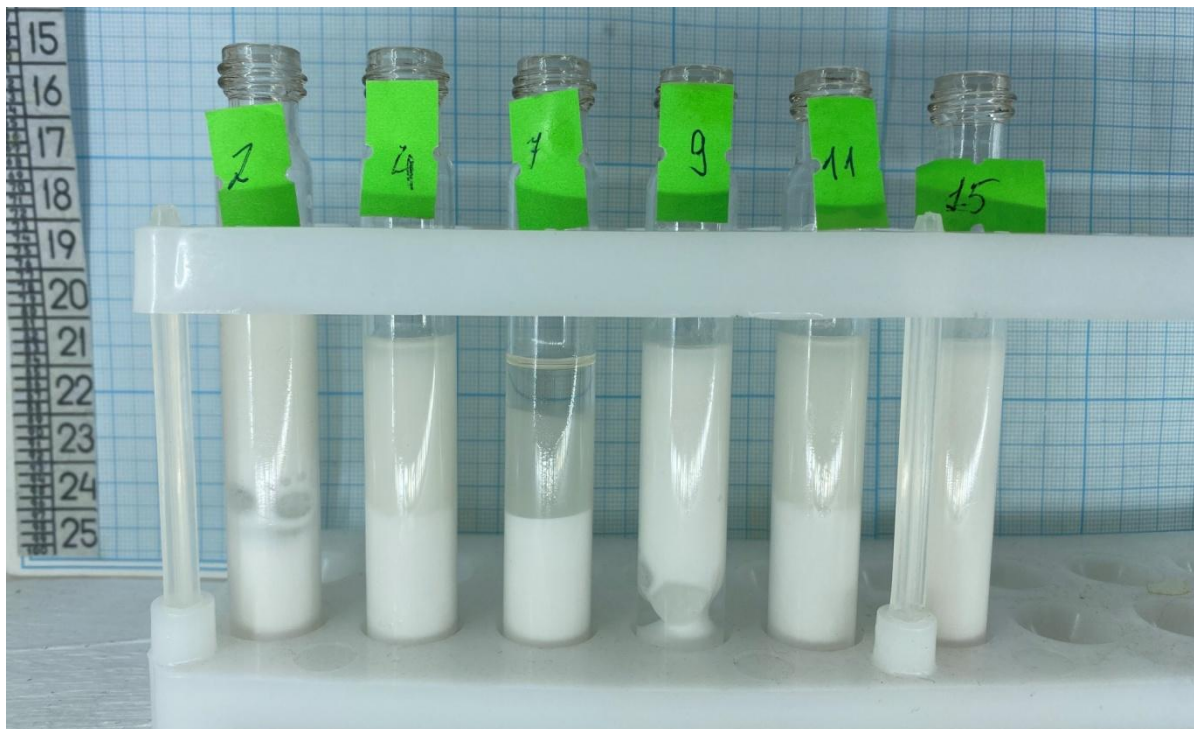


Рисунок 6 - Образцы эмульсий, не отвечающие требованию ОФС «Эмульсии» по показателю внешний вид

Образцы эмульсий №2, №7, №11, представленные на рисунке 6 расслаивались в течение 30 минут наблюдения. Образцы №4, №9 и №11 и 15 – расслаивались в течение 24 часов хранения.

Вторым этапом контроля результатов технологического эксперимента было визуальное наблюдение после центрифугирования в течение 30 мин. В ряде образцов наблюдалось небольшое отделение в верхней части флакона слоя прозрачного масла высотой до 10 мм³, при этом остальная масса была представлена нормальной эмульсией (рис.7). Данное состояние называется «креминг» и является допустимым.

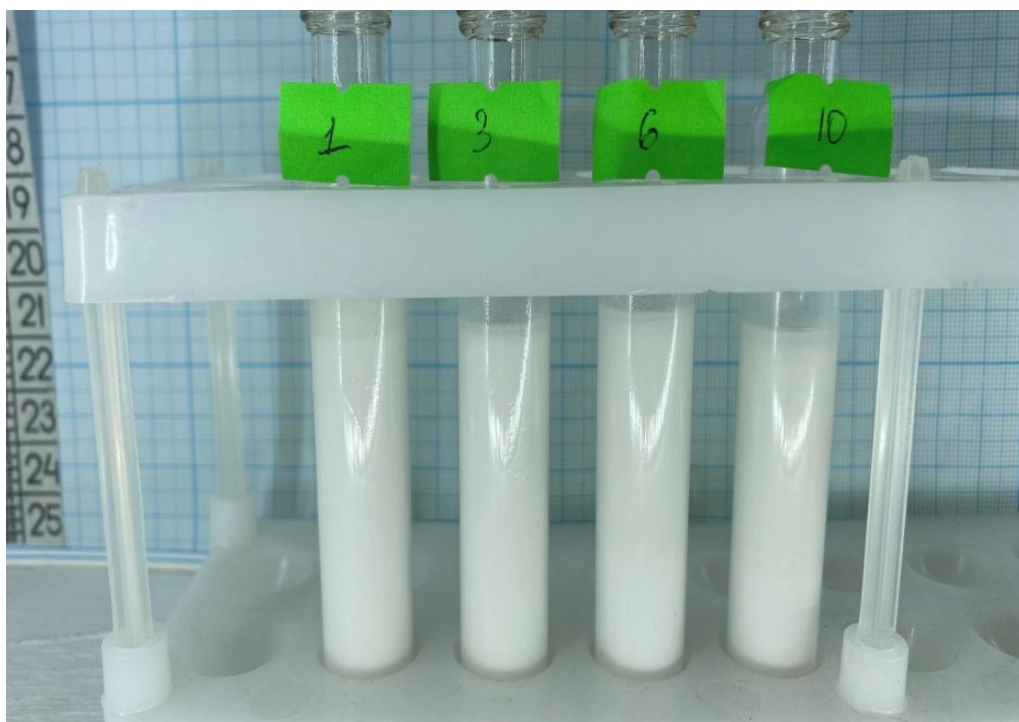


Рисунок 7 – Образцы эмульсий в состоянии «креминг», после центрифугирования

При определении стабильности, полученных образцов эмульсионной вакцины, мы сталкивались еще с одним обратимым изменением эмульсии, которое является недопустимым в производстве инактивированных эмульсионных вакцин - «ситтинг» (рис.8-9).

В данном случае вакцина после центрифугирования была разделена на две фракции: верхнюю жидкую, более прозрачную, и нижнюю более густую (рис.8).



Рисунок 8 - Образцы эмульсии №16, 18 в состоянии «ситтинг»

Такое явление возникало в результате нарушения температурного режима или при избытке инактивированного антигена (дисперсной фазы).

Повышение температуры смеси наблюдалось при диспергировании и гомогенизации препарата и напрямую влияло на стабильность эмульсии.



Рисунок 9 - Образцы эмульсий №16 в состоянии ситтинг и № 3 в состоянии «креминг», при хранении в течение 10 суток

При подборе эмульгатора и соэмульгаторов, было отмечено необратимое изменение эмульсии, при котором происходило отделение водной фракции, локализованной в нижней части флакона с четкой линией раздела от верхней фракции. Данные изменения развивались при использовании эмульгаторов «Ламесофт» и комбинации твин-80 с наноалмазами (рис.10).



Рисунок 10 – Образцы эмульсий №13, №17 (после центрифугирования)

Таким образом, после центрифугирования седиментационно устойчивыми (стабильными) оставались образцы № 1, 3, 5, 8, 10, 12, 14.

Однако, при хранении в холодильнике в течение 10 дней образы №1, 10, 12 расслаивались, образуя кольцо расслоения на поверхности жидкости (рис.11).

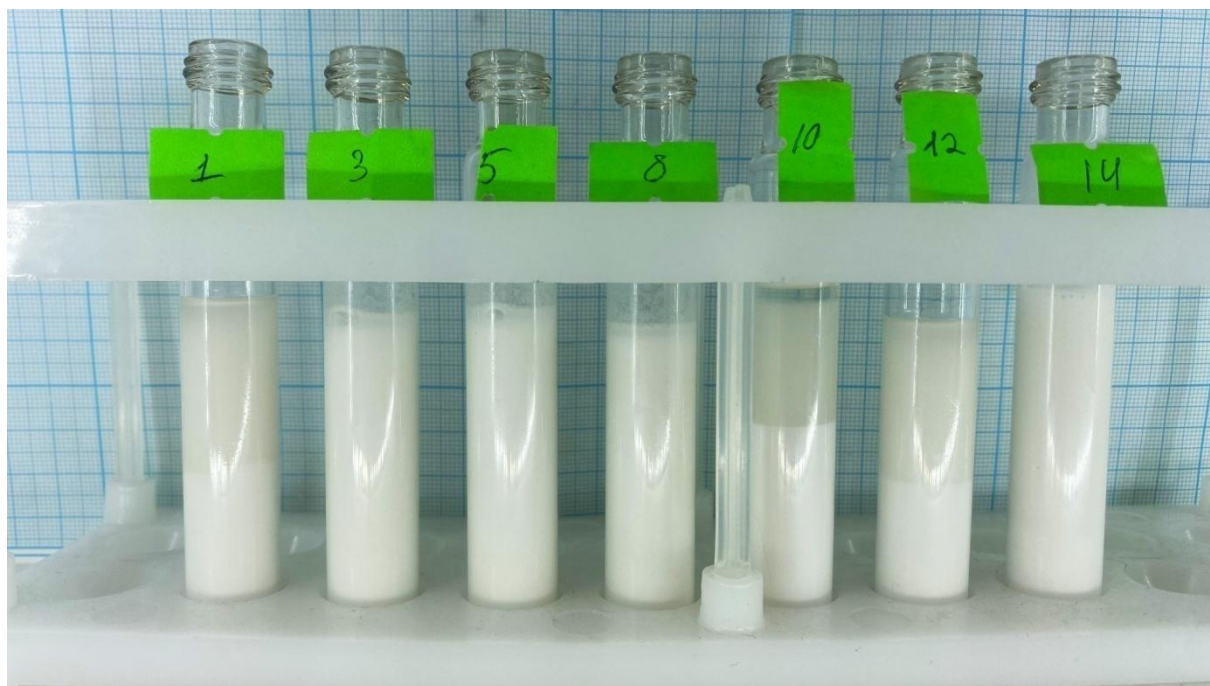


Рисунок 11 – Образцы эмульсии после 10 дней хранения

Таким образом, в дальнейшей работе использовали образцы под номерами 3, 5, 8, 14, содержащие эмульгаторы: олеат ПЭГ (3), манитол моноолеат (5), сорбитан олеат (8), моноолеат стеариновой кислоты (14), в сочетании с Твин-80.

Следующим этапом наших исследований явилось изучение количественного содержания, взаимного влияния и совместимости эмульгаторов в составе масляного адьюванта.

3.1.2 Изучение совместимости и взаимного влияния, различных эмульгирующих компонентов

Анализ взаимодействия и совместимости различных эмульгаторов, используемых при изготовлении масляных адьювантов, включал исследование следующих критических параметров процесса, схематично представленных на рисунке 12:



Рисунок 12 – Критические параметры процесса

Смесь двух эмульгаторов, один из которых растворяется только в воде, а другой в масле, из-за различного соотношения гидрофобных и гидрофильных частей обоих эмульгаторов, часто способствует более стабильному эмульгированию [150, 151].

Анализ составов полученных масляных адьювантов показал, что наиболее стабильными оказались композиции (№ 3, 5, 8, 14), содержащие неионогенные эмульгаторы растворимые в масляной фазе: олеат ПЭГ, манитол моноолеат, сорбитан олеат, моноолеат стеариновой кислоты в сочетании с Твин-80, хорошо растворимом в воде.

Изучение научно-технической и патентной литературы показало, что в раствор антигена Твин-80 добавляют в количестве (1 - 5%), в этой

концентрации эмульгатор нетоксичен. В концентрации до 2% надежно нетоксичен [134, 135]. В данной концентрации Твин-80 выполняет роль не только эмульгатора, но и стабилизатора гетерогенной системы, обеспечивает стабильность эмульсии, препятствуя отделению капель водной фазы и снижает вязкость [135].

Согласно ГОСТ 33821-2016, кинематическая вязкость инактивированной эмульгированной вакцины против гриппа птиц должна быть не более 200 мм²/с [27]. Практические исследования вакцинологов, показывают, что вакцины с вязкостью 200 мм²/с нередко создают трудности при введении их путем инъекции, это замедляет процесс массовой вакцинации птиц, в связи с чем, более предпочтительными являются эмульсионные вакцины с вязкостью от 40 до 150 мм²/с [1, 3].

Экспериментально доказано влияние добавок Твин-80 на вязкость и стабильность эмульсии, это наглядно показано на рисунках 13, 14.

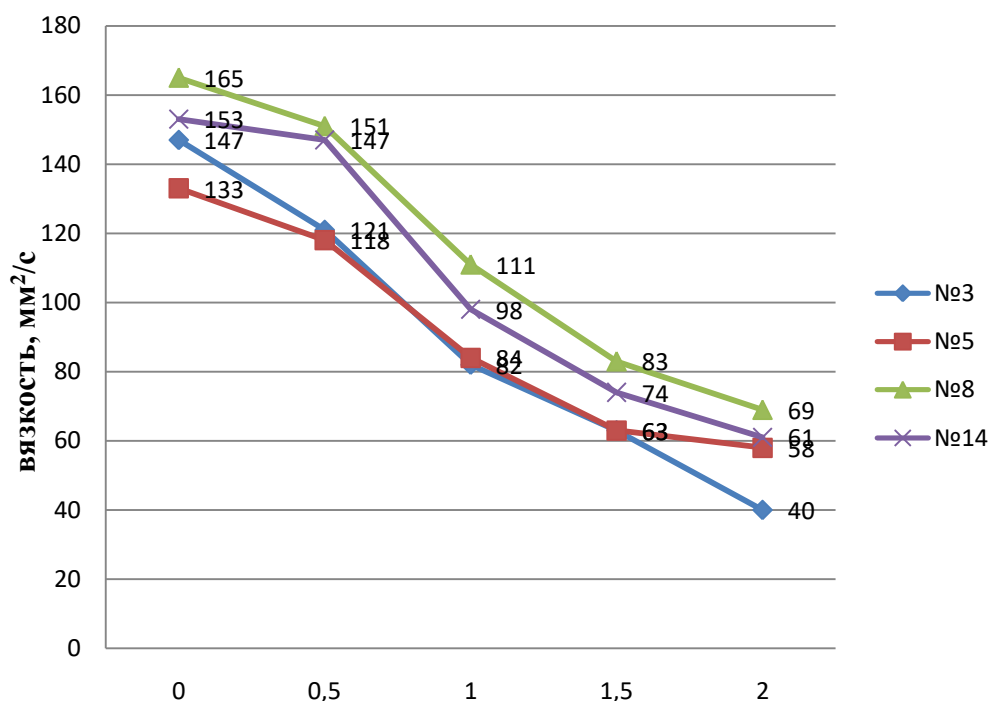


Рисунок 13 – Влияние добавок Твин-80 на вязкость образцов эмульсии № 3, 5, 8, 14

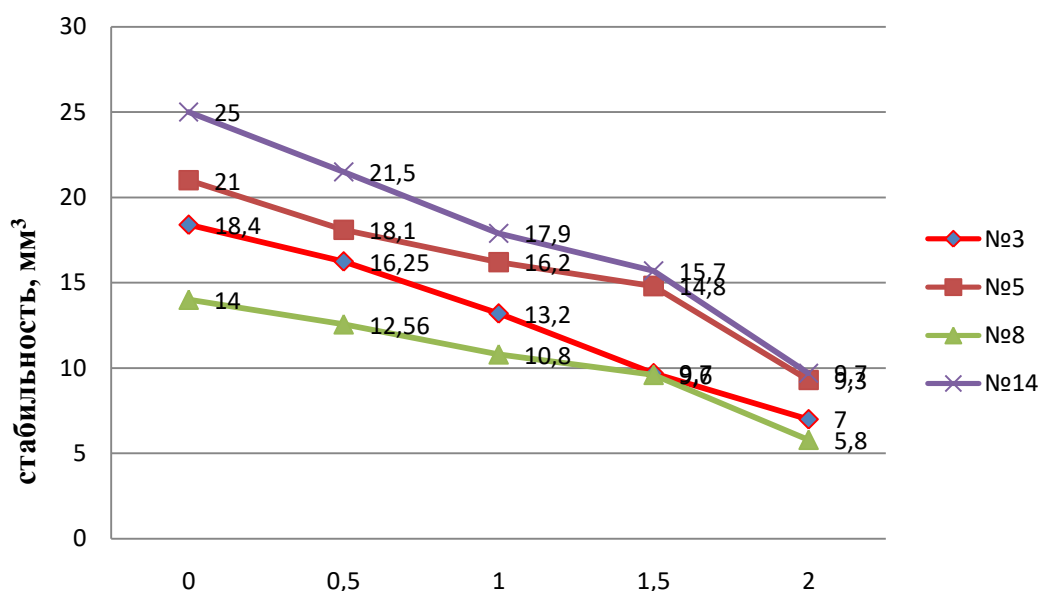


Рисунок 14 – Влияние Твин-80 на стабильность образцов эмульсии № 3, 5, 8, 14

Как следует из диаграмм, приведенных на рисунке 13-14, содержание Твин-80 в смеси менее 2% в присутствии эмульгатора сорбитан олеата, манитола, олеата ПЭГ и моноолеата стеариновой кислоты в количестве до 10% влияет на показатели вязкости и стабильности эмульсии (рис. 14). Так при содержании Твин-80 в смеси 0,5% вязкость составляла в среднем до 145 мм²/с. Существенно изменяется диаграмма за счет сдвига в сторону понижения вязкости при добавлении к смеси от 0,5 до 1,5% Твин-80.

При использовании эмульгаторов сорбитан олеата, манитола моноолеата, олеата ПЭГ и моноолеата стеариновой кислоты в присутствии 1% Твин-80 вязкость снижалась и составляла величину порядка 98-80 мм²/с. Увеличение содержания эмульгатора Твин-80 до 1,5% от массы смеси приводит к тому, что вязкость понижается в среднем до 70 мм²/с.

Для определения компонента, оказывающего статистически значимое влияние на исследуемые параметры системы (вязкость и стабильности получаемой эмульсии) нами был использован метод дисперсионного анализа (ANOVA). Использование метода ANOVA в отношении данных о влиянии различных факторов на вязкость и стабильность вакцины построена на принципе разложения изменчивости этого значения. Поскольку были

выбраны суммы квадратов III рода (по умолчанию), вклад каждого фактора измерялся без учета влияния всех других факторов. Р-значения проверяют статистическую значимость каждого из факторов. С помощью метода ANOVA было установлено, что контролируемые факторы (концентрация Твин-80 и тип образца), представленные на рисунках 13-14 оказывают статистически значимое влияние, как на коллоидную стабильность, так и на вязкость эмульсии с доверительной вероятностью 95,0%. (табл. 6 - 7), поскольку Р-значения меньше 0,05.

Таблица 6 - Дисперсионный анализ показателя «вязкость» через сумму квадратов типа III

Источник	Сумма квадратов	Df	Средний квадрат	Соотношение F	Р-значение
Основные эффекты					
А: Твин - 80 ANOVA	50432,40	4	12608,10	998,66	0,00
В: Образец	5135,27	3	1711,76	135,58	0,00
Взаимодействия					
АВ	837,60	12	69,80	5,53	0,00
Остаточный	252,50	20	12,62		
Итого (исправлено)	56657,80	39			

Таблица 7-Дисперсионный анализ показателя «стабильность» через сумму квадратов III типа

Источник	Сумма квадратов	Df	Средний квадрат	Соотношение F	Р-значение
Основные эффекты					
А: Твин - 80 ANOVA	614,37	4	153,59	426,96	0,00
В: Образец	314,09	3	104,70	291,03	0,00
Взаимодействия АВ	37,17	12	3,09	8,61	0,00

1	2	3	4	5	6
Остаточный	7,19	20	0,36		
Итого (исправлено)	972,86	39			

Примечания к табл. 6 и 7:

Все F-отношения основаны на остаточной средней квадратичной ошибке.

Фактор А - концентрация твина 80 на пяти уровнях: 1 - 0; 2 - 0.5%; 3 - 1%; 4 - 1,5%; 5 - 2%.

Фактор В - образец на четырех уровнях: 1 - №3; 2 - №5; 3 - №8; 4 - №14.

Анализ значений представленных в таблице 6 и 7 (метод ANOVA) для вязкости выявил основной эффект влияния Твин-80 с суммой квадратов 50432,4 на 4 степени свободы, что привело к соотношению F - 998,66 и значению P - 0,0000 (для вязкости табл. 6), а для стабильности F- 426,96 при значении P – 0,0000. Кроме того, фактор образца и взаимодействие между концентрацией Твин-80 и типом образца также были значимыми, что указывает на то, что как количество Твин-80, так и идентичность образца эмульсии существенно влияют на вязкость и стабильность.

Данные, полученные методом ANOVA, позволили нам применить критерий Тьюки для определения зависимости влияния исследуемого фактора (количество Твин-80) на стабильность и вязкость вакцины. Результаты использования критерия Тьюки в отношении фактора (концентрация Твин-80) представлены в виде графиков (рис.15-16), которые оказались идентичными экспериментальным графикам, представленным на рисунках 13-14.

Interactions and 95.0 Percent Tukey HSD Intervals

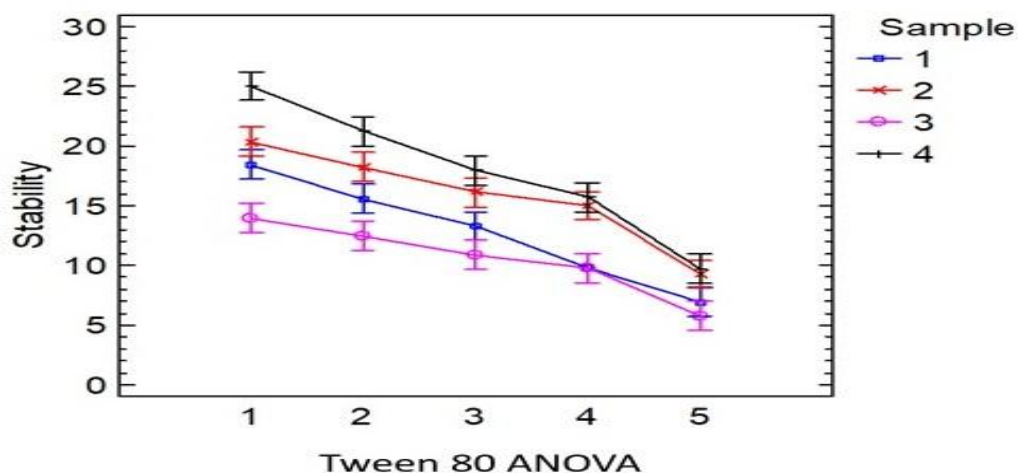


Рисунок 15 - Влияние Твин-80 на стабильность эмульсии

Interactions and 95.0 Percent Tukey HSD Intervals

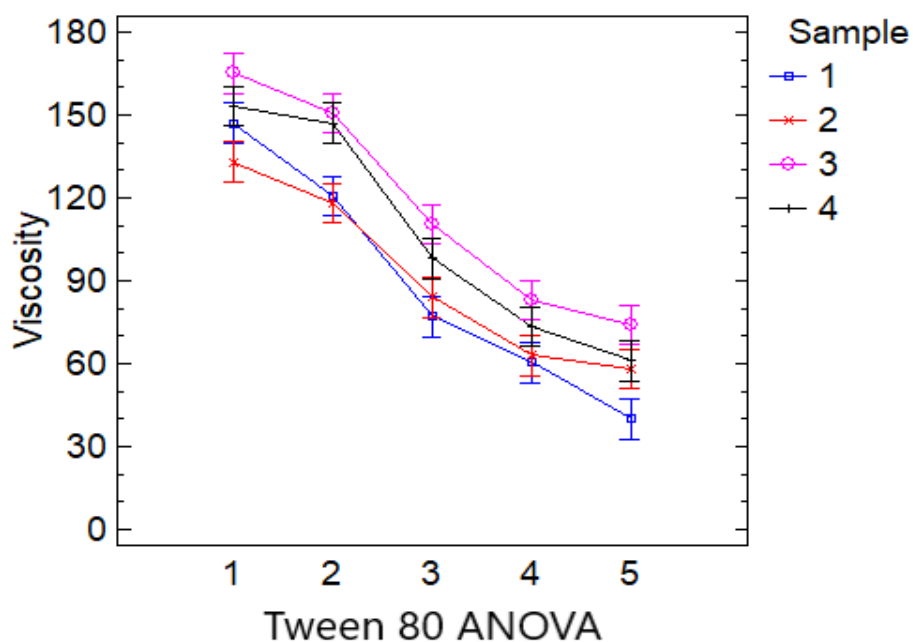


Рисунок16 - Влияние Твин-80 на вязкость эмульсии

Использование критерия Тьюки в части процедуры достоверно значимой разницы (HSD) влечёт за собой риск порядка 5,0% назвать одну или несколько пар существенно отличающимися, когда их фактическая разница равна 0 (метод: 95,0% HSD Тьюки). Результаты представлены в таблицах 8-9.

Таблица 8 - Статистическая обработка данных определения стабильности эмульсии методом Тьюки после применения дисперсионного метода анализа (ANOVA)

Твин-80 ANOVA	Считать	LS Среднее значение	ЛС Сигма	Однородные группы
5	8	58,25	1,26	X
4	8	70,00	1,26	X
3	8	92,37	1,26	X
2	8	134,00	1,26	X
1	8	149,50	1,26	X

Таблица 9 - Статистическая обработка данных определения стабильности эмульсии методом Тьюки, после применения дисперсионного метода анализа (ANOVA). Множественное сравнение средних значений

Контраст	Sig.	Разница	+/- Лимиты
1 – 2	*	15,50	5,31
1 – 3	*	57,13	5,31
1 – 4	*	79,50	5,31
1 – 5	*	91,25	5,31
2 – 3	*	41,62	5,31
2 – 4	*	64,00	5,31
2 – 5	*	75,75	5,31
3 – 4	*	22,37	5,31
3 – 5	*	34,16	5,31
4 – 5	*	11,75	5,31

* - обозначает статистически значимую разницу.

Многодиапазонные испытания на стабильность или вязкость с помощью Твин - 80 ANOVA(метод: 95,0 % Tukey HSD) (табл. 10 -11)

Таблица 10 - Статистическая обработка данных определения вязкости эмульсии методом Тьюки

Твин - 80 ANOVA	Считать	LS Среднее значение	ЛС Сигма	Однородные группы
5	8	7,93	0,21	X
4	8	12,55	0,21	X
3	8	14,57	0,21	X
2	8	16,87	0,21	X
1	8	19,43	0,21	X

Таблица 11 - Статистическая обработка данных определения вязкости эмульсии методом Тьюки, после обработки дисперсионным методом анализа (ANOVA). Множественное сравнение средних значений

Контраст	Sig.	Разница	+/- Лимиты
1 – 2	*	2,560	0,890
1 – 3	*	4,860	0,890
1 – 4	*	6,880	0,890
1 – 5	*	11,510	0,890
2 – 3	*	2,30	0,890
2 – 4	*	4,320	0,890
2 – 5	*	8,950	0,890
3 – 4	*	2,020	0,890
3 – 5	*	6,650	0,890
4 – 5	*	4,620	0,890

* обозначает статистически значимую разницу.

В таблицах 8-11 представлены расчетные данные, полученные в рамках процедуры множественного сравнения для определения какие из средних значений в наибольшей степени отличаются друг от друга. Пять однородных

групп обозначены с помощью столбцов X. В каждом столбце уровни, содержащие X, образуют группу средних, внутри которых нет статистически значимых различий. Значения, представленные в таблицах 9 и 11, демонстрируют оценочную разницу между каждой парой средних. Знак «*» рядом с десятью парами указывает на то, что эти пары демонстрируют статистически значимые различия с доверительной вероятностью 95,0%.

Таким образом в серии экспериментов оценивался эффект добавления Твина-80 при пяти (1-5) уровнях концентрации (0; 0,5%; 1%; 1,5%; и 2%) на стабильность и вязкость четырех различных образцов эмульсий (№3, №5, №8, №14) и показана четкая тенденция, при которой использование Твин-80 приводит к выраженному снижению измеренной вязкости и повышению стабильности. Например, при концентрации Твин-80 - 0% значения вязкости находятся в диапазоне примерно от 130 до 165 мм²/с, тогда как при 2% значения вязкости падают до уровней примерно 40–61 мм²/с.

Учитывая полученные экспериментальные данные (рис.13 и 14), а также результат их обработки с использованием методов ANOVA и критерия Тьюки, для дальнейших исследований использовались образцы эмульсий № 3, №5, №8, №14, содержащие Твин-80 в количестве 2% по массе адьюванта. Использование указанной концентрации, в том числе обеспечило соответствие готовой вакцины требованиям ГОСТ 33821-2016 по показателям стабильность и вязкость.

3.2 Влияние количественного содержания масла и смеси эмульгаторов на основные показатели качества готового продукта

Одной из целей настоящего исследования было научно-экспериментальное обоснование возможности импортозамещения масляного адьюванта, используемого для производства ветеринарной вакцины против птичьего гриппа типа А подтипа H5N1. Необходимым условием для этого

явилось изучение возможности получения продукта, не уступающего адьюванту Montanide производства Seppic.

Минеральное масло является основным компонентом неполного адьюванта Фрейнда. Значительная доля минерального масла в составе изучаемой группы биопрепаратов налагает особые требования к качеству исходного сырья. В связи с этим первоначальные исследования, связанные с подбором эмульгатора, продолжали выполняться с использованием минерального масла Mobil IMarcol- 52 производства Exxon Mobil (CAS number: 8042-47-5), соответствующее EN ISO 9000.

Использование этого масла на первом этапе работы позволило существенно сократить и уменьшить объем опытов по подбору композиции эмульгаторов и затем технологию адьюванта и собственно вакцины.

Анализ ассортимента выпускаемых масляных адьювантов, показал, что они состоят из 90–98% минеральных и синтетических масел и 2–10% эмульгаторов, данные концентрации веществ оказывают умеренно реактогенное воздействие на организм вакцинируемых [2, 3, 39, 144].

Последующая серия опытов была посвящена оценке влияния количественного содержания эмульгаторов в составе масляного адьюванта на основные показатели качества эмульсионной вакцины (табл.12).

Таблица 12– Сравнительная оценка влияния содержания смеси эмульгаторов на вязкость и стабильность эмульсий (n=3)

Состав адьюванта	Описание	Стабильность после центрифугирования, мм	Вязкость, мм ² /с
1	2	3	4
Масло - 90,0 % Олеат ПЭГ-8 % Твин-80 – 2%	Однородная эмульсия, расслоение отсутствует	8,28±0,1	60,80±0,7
Масло-90,0 % Манитол моноолеат-8 % Твин-80 – 2%	Однородная эмульсия, расслоение отсутствует	6,86±0,3	39,10±0,2

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4
Масло-90,0 % Сорбитан олеат-8 % Твин-80 – 2%	Однородная эмульсия, расслоение отсутствует	5,40±0,2	66,00±0,3
Масло-90,0 % Моноолеат стеариновой кислоты - 8 % Твин-80 - 2%	Однородная эмульсия, расслоение отсутствует	9,20±0,1	59,20±0,6
Масло - 89,0 % Олеат ПЭГ-9 % Твин-80 - 2%	Однородная эмульсия, расслоение отсутствует	3,96±0,05	55,80±0,1
Масло - 89 % Манитол моноолеат -9 % Твин-80 - 2%	Однородная при стоянии в течение суток в холодильнике, расслоение отсутствует, текучая	0,80±0,1	35,40±0,1
Масло - 89 % Сорбитан олеат -9 % Твин-80 - 2%	Однородная при стоянии в течение суток в холодильнике расслоение отсутствует, текучая	3,57±0,1	52,44±0,3
Масло - 89% Моноолеат стеариновой кислоты - 9% Твин-80 - 2%	Непрозрачная маслянистая жидкость белого цвета без запаха при стоянии в течение суток небольшое расслоение	3,10±0,1	34,85±0,3
Масло-88,5 % Олеат ПЭГ -9,5% Твин-80 - 2%	Однородная при стоянии в течение суток в холодильнике расслоение отсутствует, текучая	4,00±0,1	56,30±0,1
Масло-88,5 % Манитол моноолеат -9,5% Твин-80 – 2%	Однородная при стоянии в течение суток в холодильнике расслоение отсутствует, текучая	2,80±0,1	36,17±0,2
Масло-88,5% Сорбитан олеат -9,5 % Твин-80 - 2%	Однородная при стоянии в течении суток в холодильнике расслоение отсутствует, текучая	3,44±0,2	62,10±0,5
Масло-88,5 % Моноолеат стеариновой кислоты - 9,5 % Твин-80 - 2%	Однородная при стоянии в течение суток в холодильнике расслоение отсутствует, текучая	4,54±0,1	35,30±0,1

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4
Масло – 88,0 % Олеат ПЭГ -10 % Твин-80 - 2%	Однородная при стоянии в течение суток в холодильнике расслоение отсутствует, текучая	6,50±0,1	57,00±0,4
Масло-88,0 % Манитол моноолеат -10 % Твин-80 - 2%	Однородная при стоянии в течение суток в холодильнике расслоение отсутствует, текучая	5,10±0,1	38,91±0,1
Масло -88,0% Сорбитан олеат -10 % Твин-80 - 2%	Однородная при стоянии в течение суток в холодильнике расслоение отсутствует, текучая	6,40±0,3	62,32±0,5
Масло – 88,0 % Моноолеат стеариновой кислоты10% Твин-80 - 2%	Непрозрачная маслянистая жидкость белого цвета без запаха при стоянии в течение суток присутствует небольшое расслоение	7,28±0,1	35,80±0,2
Масло - 86,5 % Олеат ПЭГ - 11,5% Твин-80 - 2%	Непрозрачная маслянистая жидкость белого цвета без запаха при стоянии в течение суток присутствует небольшое расслоение	7,50±0,1	58,00±0,5
Масло - 86,5 % Манитол моноолеат 11,5% Твин-80 - 2%	Непрозрачная маслянистая жидкость белого цвета без запаха при стоянии в течение суток присутствует небольшое расслоение	6,30±0,2	39,20±0,2
Масло - 86,5 % Сорбитан олеат -11,5% Твин-80- 2%	Непрозрачная маслянистая жидкость белого цвета без запаха при стоянии в течение суток присутствует небольшое расслоение	7,20±0,1	67,00±0,3
Масло - 86,5% Моноолеат стеариновой кислоты 11,5% Твин-80 - 2%	Непрозрачная маслянистая жидкость белого цвета без запаха при стоянии в течение суток присутствует небольшое расслоение	7,80±0,1	50,10±0,5

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4
Масло- 86,0 % Олеат ПЭГ -12% Твин-80 - 2%	Непрозрачная маслянистая жидкость белого цвета без запаха при стоянии в течение суток присутствует небольшое расслоение	7,60±0,1	59,00±0,2
Масло- 86,0 % Манитол моноолеат- 12% Твин-80 - 2%	Непрозрачная маслянистая жидкость белого цвета без запаха при стоянии в течение суток присутствует небольшое расслоение	6,59±0,1	39,40±0,1
Масло- 86,0 % Сорбитан олеат- 12% Твин-80 - 2%	Непрозрачная маслянистая жидкость белого цвета без запаха при стоянии в течение суток присутствует небольшое расслоение	7,60±0,1	68,20±0,5
Масло- 86% Моноолеат стеариновой кислоты - 12% Твин-80 - 2%	Непрозрачная маслянистая жидкость белого цвета без запаха при стоянии в течение суток присутствует небольшое расслоение	9,70±0,2	60,40±0,4

Используя значения, представленные в таблице, были построены кривые зависимости основных показателей качества эмульсий от содержания масла и смеси эмульгаторов (рис.17).

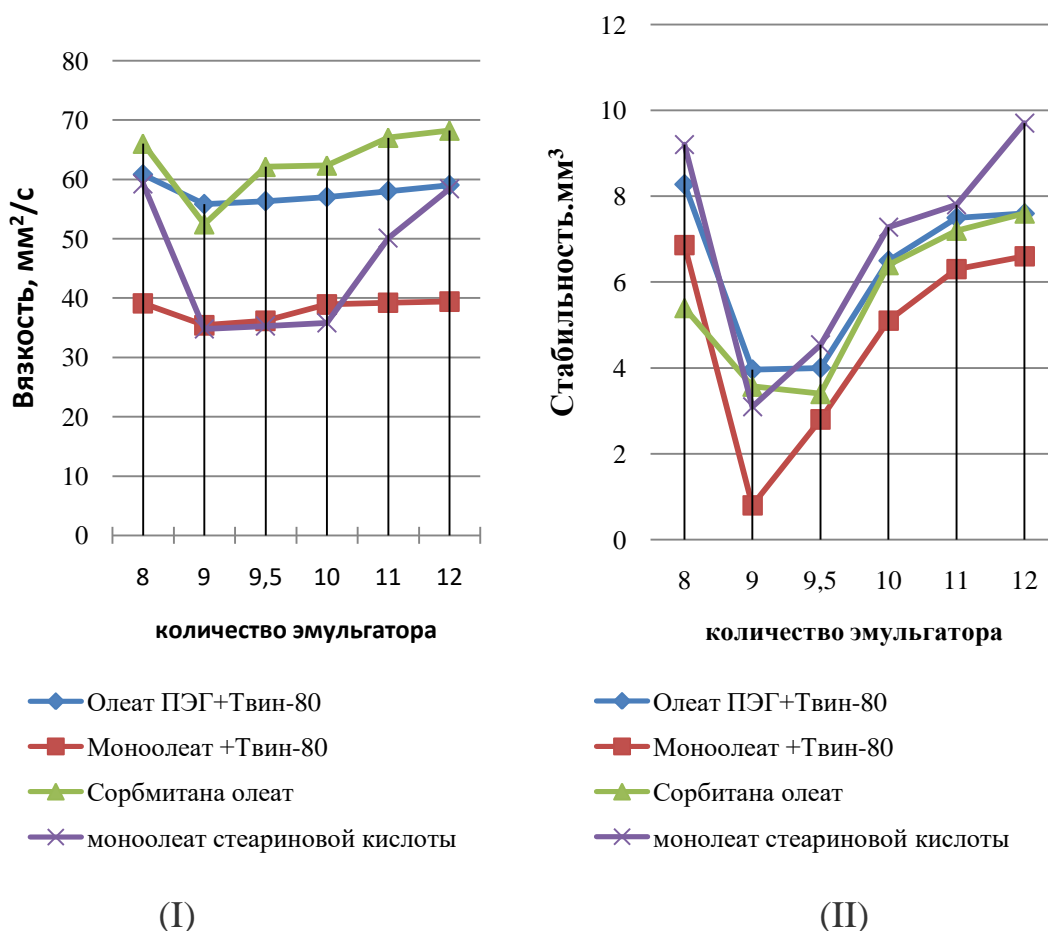


Рисунок 17 - Влияние количественного содержания смеси эмульгаторов в составе масляного адьюванта на (I)–вязкость и (II)– стабильность эмульсий

Результаты исследований, представленные на диаграммах, показывают существенную зависимость между количественным содержанием эмульгаторов в составе масляного адьюванта и основными физико-химическими характеристиками эмульсии. Образцы масляных адьювантов с содержанием масла 89%, Твин-80 - 2% и соэмульгаторов - 9% являются более стабильными и менее вязкими.

Для оценки влияния типа и концентрации эмульгатора на физико-химические параметры вакцины нами был также использован метод дисперсионного анализа. Методом ANOVA обрабатывались показатели, полученные в ходе исследования различных свойств эмульсии (коллоидная стабильность и вязкость), фиксируемые при изменении, как содержания масла, так и состава смеси эмульгаторов, в частности данные рисунка 17:

Было установлено, что контролируемые факторы (фактор А - тип эмульгатора на четырех уровнях: 1 –Олеат ПЭГ; 2 –Маннитол моноолеат; 3 – Сорбитан олеат; 4 - Моноолеат стеариновой кислоты тип эмульгатора и его концентрация; фактор В - концентрация (в %) эмульгатора на шести уровнях: 1 - 8; 2 - 9; 3 – 9,5; 4 - 10; 5 – 11,5; 6 – 12) оказывают статистически значимое влияние, как на коллоидную стабильность, так и на вязкость эмульсии (табл. 13-14).

Таблица 13 - Дисперсионный анализ показателя «коллоидная стабильность» через сумму квадратов III типа

Источник	Сумма квадратов	Df	Средний квадрат	Соотношение F	P-значение
Основные эффекты					
А:Фактор А	44,43	3	14,81	1418,58	0,00
В:Фактор В	277,15	5	55,43	5309,27	0,00
Взаимодействия					
АВ	26,19	15	1,75	167,26	0,00
Остаточный	0,50	48	0,01		
Итого (исправлено)	348,27	71			

Все F- отношения основаны на остаточной средней квадратичной ошибке.

Таблица 14 - Дисперсионный анализ показателя «вязкость» через сумму квадратов типа III

Источник	Сумма квадратов	Df	Средний квадрат	Соотношение F	P-значение
Основные эффекты					
А:Фактор А	6934,28	3	2311,43	61169,08	0,00
В:Фактор В	1518,44	5	303,68	8036,71	0,00
Взаимодействия АВ	1310,98	15	87,39	2312,91	0,00

Продолжение таблицы 14

1	2	3	4	5	6
Остаточный	1,81	48	0,037		
Итого (исправлено)	9765,51	71			

Примечание к табл. 13 и 14:

Все F- отношения основаны на остаточной средней квадратичной ошибке.

Фактор А- тип эмульгатора (с четырьмя уровнями: олеат ПЭГ, маннитол моноолеат, сорбитан олеат и моноолеат стеариновой кислоты);

Фактор В-концентрация эмульгатора (шесть уровней: 8%, 9%, 9,5%, 10%, 11,5% и 12%).

Для коллоидной стабильности методом ANOVA установлено, что на долю коэффициента В (концентрация) приходится очень большая часть изменчивости (сумма квадратов = 277,151 против 44,4311 для фактора А), с коэффициентом F - 5309,27 (P=0,0000). Полученные значения указывают на то, что конечная коллоидная стабильность эмульсии в наибольшей степени чувствительна к изменениям концентрации эмульгатора, чем к типу используемого эмульгатора.

Для показателя «вязкость» наблюдается обратная ситуация. Метод ANOVA для показателя «вязкость» указывает на то, что фактор А (тип эмульгатора) вносит значительно больший (сумма квадратов - 6934,28) вклад относительно фактора В (сумма квадратов-1518,44), о чем свидетельствует очень высокое соотношение F (F - 61 169,08 для фактора А по сравнению с F - 8036,71 для фактора В) и значения P - 0,0000. Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что, концентрация эмульгатора в значительной степени определяет коллоидную стабильность, но тип эмульгатора (молекулярная структура) оказывает преимущественное влияние на вязкость эмульсии.

Среди контролируемых факторов большую и значимую степень влияния на коллоидную стабильность имеет фактор В - концентрация эмульгатора (79,6%), при этом на вязкость в большей степени влияет тип

эмульгатора фактор А (71,0%), влияние концентрации оказалось меньше (15,5%), но также значимым.

Статистический анализ влияния компонентов, являющихся подфакторами системы А (различные по химическому строению эмульгаторы) на вязкость и коллоидную стабильность получаемых эмульсий позволяет сделать вывод о том, что доля вклада типа эмульгатора (под фактора системы А) составляет 71%, что является значительной статистически значимой величиной.

Цифровые значения, полученные методом ANOVA, позволяют нам так же применить критерий Тьюки для определения зависимости влияния исследуемого фактора А (тип эмульгатора) на стабильность и вязкость системы. Результаты использования критерия Тьюки в отношении фактора «Тип эмульгатора» представлены в виде рисунка 18-20, в таблицах 15-18 и на рисунках 19,20, которые оказались идентичными графикам, представленным на рисунке 17.

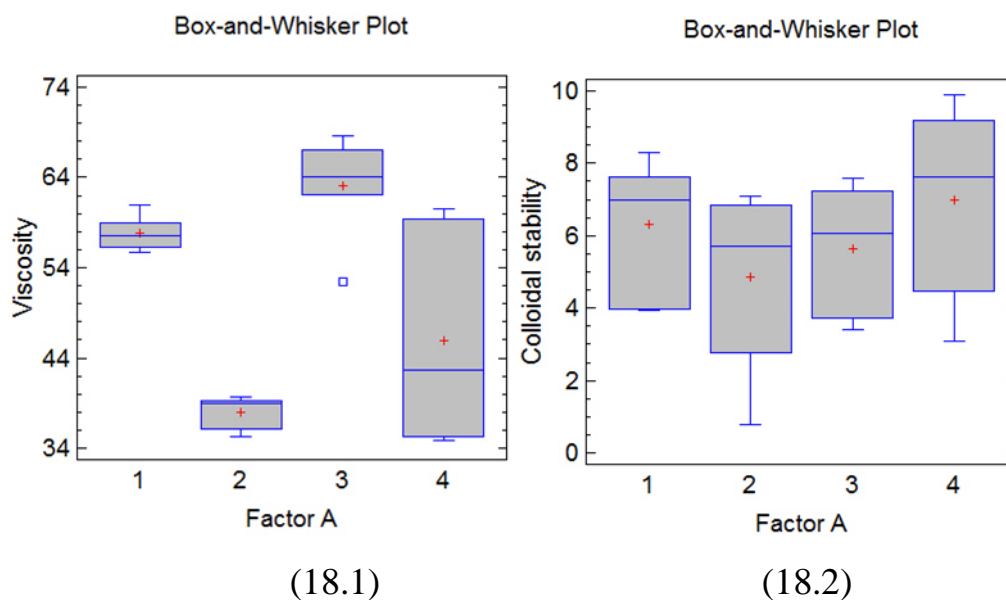


Рисунок 18 - Влияние Фактора А на свойства эмульсий (18.1- влияние Фактора А на вязкость вакцины; 18.2- влияние Фактора А на коллоидную стабильность вакцины)

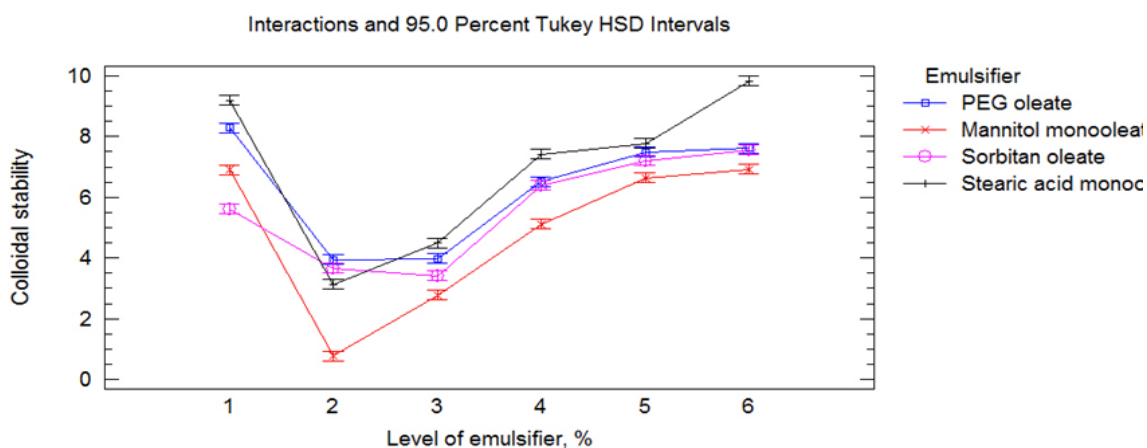


Рисунок 19 - Влияние типа эмульгатора на коллоидную стабильность СИСТЕМЫ

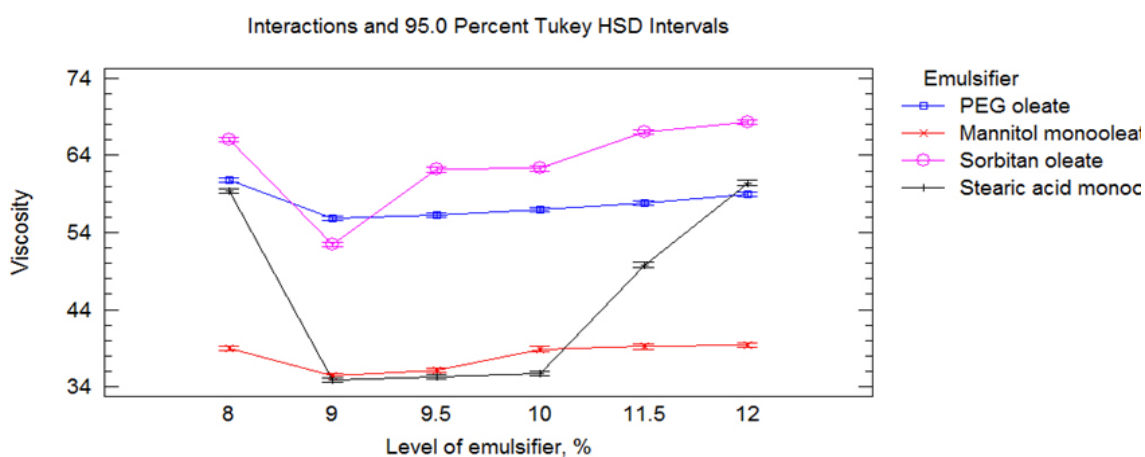


Рисунок 20 - Влияние типа эмульгатора на вязкость системы

Апостериорный анализ Тьюки выявил отдельные группы среди четырех типов эмульгаторов, при этом средние значения стабильности постепенно увеличивались или уменьшались по уровням. Сравнение HSD Тьюки также продемонстрировало, что каждая пара типов эмульгаторов дает значительные различия в измеренной вязкости, при этом средние значения групп варьируются примерно от 38,01 мм²/с до 63,04 мм²/с.

Таблица 15 - Статистическая обработка данных определения влияния фактора А (тип эмульгатора) на коллоидную стабильность эмульсии методом Тьюки

Фактор А	Считать	LS Среднее значение	ЛС Сигма	Однородные группы
2	18	4,86	0,02	X
3	18	5,64	0,02	X
1	18	6,31	0,02	X
4	18	6,97	0,02	X

Таблица 16 - Статистическая обработка данных определения влияния фактора А (тип эмульгатора) на коллоидную стабильность эмульсии методом Тьюки. Множественное сравнение средних значений

Контраст	Sig.	Разница	+/- Лимиты
1 - 2	*	1,44	0,09
1 - 3	*	0,66	0,09
1 - 4	*	-0,67	0,09
2 - 3	*	-0,78	0,09
2 - 4	*	-2,11	0,09
3 - 4	*	-1,33	0,09

* обозначает статистически значимую разницу.

Таблица 17 - Статистическая обработка данных определения влияния фактора А (тип эмульгатора) на вязкость эмульсии методом Тьюки

Фактор А	Считать	LS Среднее значение	ЛС Сигма	Однородные группы
2	18	38,01	0,04	X
4	18	45,91	0,04	X
1	18	57,77	0,04	X
3	18	63,04	0,04	X

Таблица 18 - Статистическая обработка данных определения влияния фактора А (тип эмульгатора) на вязкость эмульсии методом Тьюки. Множественное сравнение средних значений

Контраст	Sig.	Разница	+/- Лимиты
1 - 2	*	19,76	0,17
1 - 3	*	-5,26	0,17
1 - 4	*	11,85	0,17
2 - 3	*	-25,02	0,17
2 - 4	*	-7,90	0,17
3 - 4	*	17,12	0,17

* обозначает статистически значимую разницу.

В результате проведённых исследований, можно заключить, что базовый состав адьюванта, изготавливаемый в пропорции компонентов:

- масло минеральное 89%;
- Твин-80 - 2%;
- соэмульгаторов - 9%

обеспечит приемлемые показатели качества вакцины в независимости от используемого соэмульгатора в пределах перечня изученных соэмульгаторов при этом прогнозируемая вязкость получаемой вакцины будет находиться в диапазоне значений 38,01 мм²/с - 63,04 мм²/с, что соответствует требованиям пункта ГОСТ 33821-2016.

Полученные результаты послужили основой дальнейших исследований, посвященных научно-обоснованному подбору масла, которое соответствовало качеству и могло бы заменить импортное минеральное масло.

3.3 Выбор базового масла

В настоящее время минеральные белые масла, используемые в эмульсионных вакцинах, в России практически не производятся. Российские биофабрики в основном при разработке и производстве ветеринарных вакцин, используют импортные масляные адьюванты типа Montanide ISA 70 VG (Seppic, Франция), содержащие минеральное белое масло Marcol 52 (ExxonMobil, США) [92 100].

Согласно исследованиям нормативных документов, регламентирующих использование масел для производства эмульсионных вакцин, минеральное масло должно соответствовать высокому уровню чистоты [78].

В своей работе мы использовали масла, описанные выше в главе 2 раздел 2.1. При выборе масла, для создания отечественного масляного адьюванта и конструирования эмульсионной вакцины, необходимо было соответствовать следующим требованиям:

Высокий уровень чистоты. Масло должно быть глубокоочищенным, не содержать ароматических и серосодержащих углеводородов, состоять главным образом из насыщенных парафиновых и нафтеновых углеводородов.

Отсутствие запаха, воды, механических примесей, органических соединений и летучих веществ, которые могут вызывать местное воспаление тканей в месте введения вакцины и в зависимости от реактогенных свойств масла могут образовывать гранулемы, отеки, свищи, что отрицательно сказывается на жизнедеятельности животных.

Высокая термическая и химическая стабильность, нейтральное значение pH [7, 79].

На стадии разработки вакцины проявляются физико-химические свойства минеральных масел, которые влияют на качество эмульсионной

вакцины и возможность ее производства. В частности, исследованию подлежат вязкость, кислотное число, плотность, температура застывания.

3.3.1 Исследование физико-химических свойств минеральных масел

Основываясь на нормативные документы, регламентирующие использование минеральных масел, нами были определены основные показатели качества используемых в работе масел (табл.19). Исследования проводили в соответствии со стандартными методиками определения физико-химических свойств минеральных масел [7, 78].

Таблица 19 - Основные физико-химические свойства минеральных масел (п - 3)

Показатель/ НТД	SN-80	МХ-150	МГД-9	Янос	Rajol WP60	Marcol 52
Кинематическая вязкость, мм ² /с, ОФС.1.2.1. 0015 «Вязкость» ГОСТ 33 ГОСТ 19296258	2,8-4,2 ±0,7	14-18,1 ±1,1	25,7-33,0 ±1,7	6,5-8,0 ±0,8	7,2-9,4 ±1,2	7,0-8,0 ±1,0
Кислотное число, «ОФС 1.2.3.0004.15 Кислотное число», ГОСТ 5985, ГОСТ 11362	0,008 ±0,100	0,040 ±0,100	0,032 ±0,200	0,041 ±0,100	0,020 ±0,100	0,022 ±0,100
Температура застывания, ОФС.1.2.1.0012.15 Температура затвердевания ГОСТ 20287	-15±0,2	-9±0,5	-18±1	-48±0,2	-12±0,2	-6±0,5
Плотность при 20°С, г/см ³ ОФС.1.2.1.0014 «Плотность» ГОСТ 3900, ГОСТ 51069	0,8804 ±0,002	0,8902 ±0,002	0,8477 ±0,004	0,8451 ±0,007	0,8416 ±0,002	0,828 ±0,003

Согласно полученным результатам исследований, представленным в таблице 19, масла, используемые в работе, соответствовали основным технологическим характеристикам минерального белого масла Marcol 52, используемого в настоящих исследованиях в качестве референтного образца, в связи с чем могут быть использованы в дальнейшей работе.

3.3.2 Реактогенность и адьювантные свойства масел, входящих в состав масляных адьювантов

При конструировании вакцинного препарата одной из важных задач является выбор масла и изучение его реактогенных и адьювантных свойств, так как в основном масла, входящие в состав масляного адьюванта, обуславливают реактогенность препарата. Чем менее реактогенное масло, тем менее выражены поражения в точке введения препарата [7, 71].

Масло, вводимое в организм животных, должно быть безвредным, слабо или умеренно реактогенным [7, 124]. В работе использовали образцы масел, представленных в таблице раздела 3.3.1.

Оценку реактогенности масел проводили на белых мышах по методике, описанной в Главе 2 раздел 2.2.1.

Результаты оценки реактогенности испытуемых масел представлены в таблице 20.

Таблица 20 - Исследование реактогенности исследуемых образцов масел (n=10)

Название масла	Масса конечностей белых мышей после введения, г		Коэффициент реактогенности (КР%)
	Испытуемый образец, (x_0)	Контроль, (x_k)	
Rajol	1,80±0,1	2,10±0,1	-14,28±0,03
SN-80	2,40±0,1	2,00±0,1	20,00±0,12
МХ-150	2,15±0,2	2,00±0,1	7,50±0,02
МГД-9	2,50±0,3	2,20±0,2	13,60±0,06
Янос	3,40±0,1	2,10±0,3	61,90±0,05

Примечание: значение коэффициента реактогенности <24 - слабореактогенные, от 25 до 49 – умеренно реактогенные, от 50 до 99 - выраженно реактогенные, >100 – сильно реактогенные[127].

Для оценки статистических данных использовали дисперсионный метод анализа (ANOVA). Результаты представлены в таблицах 21 и 22.

Фактор А - масло: 1 - Rajol; 2 - SN-80; 3 - МХ-150; 4 - МГД-9; 5 - Янос.

Фактор В – коэффициент реактогенности

Группа: 1 - образец; 2 – контроль

Таблица 21– Обработка данных исследования реактогенности исследуемых образцов масел с помощью дисперсионного анализа (ANOVA)

Источник	Сумма квадратов	Df	Средний квадрат	Соотношение F	P-значение
Между группами	1,59	4	0,39	2,86	0,06
Внутри групп	2,08	15	0,13		
Итого (корр.)	3,68	19			

Анализ данных статистической обработки не проводился, так как вклад фактора А незначим (значение $P=0,06$ и больше $0,05$)

Таблица 22 - Обработка данных значений коэффициента реактогенности исследуемых образцов масел с помощью дисперсионного анализа (ANOVA)

Источник	Сумма квадратов	Df	Средний квадрат	Соотношение F	P-значение
Между группами	0,75	1	0,75	4,63	0,04
Внутри групп	2,92	18	0,16		
Итого (корр.)	3,67	19			

Таблица ANOVA разлагает дисперсию величин «масса лапки животного» на две составляющие: межгрупповую и внутригрупповую составляющую. F-отношение, которое в данном случае равно 4,63 представляет собой отношение межгрупповой оценки к внутригрупповой оценке. Поскольку P-значение F-критерия меньше 0,05, существует статистически значимая разница между средней массой от одного уровня к другому с доверительной вероятностью 95,0%. Эти результаты в полной мере дают понять, что химическая природа масляной фазы играет ключевую роль в биологической реакционной способности адьювантного состава, потенциально влияя на безопасность и переносимость у целевых видов животных.

Оценка реактогенности исследуемых образцов масел (табл. 20 - 22) показала, что образцы масел «Янос» и SN-80 были наиболее реактогенными. Масло «Янос» в дальнейших исследованиях не использовалось, так как проявляло выраженную реактогенную активность. Слабой реактогенностью обладало масло MX-150. Лучшим, из пяти опытных образцов масел, по результатам исследований, оказалось масло Rajol, которое обладало

отрицательным коэффициентом реактогенности (-14,28), так как отек лап мышей был меньше, чем у контрольного образца.

3.3.3 Влияние марки масла на основные показатели качества эмульсии

В ряде научных исследований, посвященных разработкам инактивированных эмульсионных вакцин, доказано, что вакцины, изготовленные на некоторых марках минеральных масел, обладают повышенной вязкостью, что существенно затрудняет процесс массовой вакцинации сельскохозяйственных животных [54, 124, 154]. Поэтому целью наших дальнейших исследований, было изучение влияния марки масел, используемых в настоящей работе, на вязкость эмульсий (табл.23).

Таблица 23 – Влияние марки масла в составе масляного адьюванта на вязкость эмульсии

Эмульгатор	Вязкость, мм ² /с			
	RajolWP60	SN-80	MX-150	МГД-9
Манитол моноолеат +Твин-80	36,5±0,3	89,3±0,5	49,8±0,3	94,8±0,4
Олеат ПЭГ-400 +Твин-80	56,0±0,1	162,4±0,4	88,0±1,1	210,5±1,5
Сорбитан олеат +Твин-80	52,4±0,2	143,5±0,3	70,3±0,6	185,4±1,2
Моноолеат стеариновой кислоты +Твин-80	36,0±0,1	124,8±0,5	62,0±0,6	138,8±0,8

Несмотря на условную идентичность по физико-химическим свойствам, исследуемые масла образовывали эмульсии с различными показателями вязкости. В ходе исследования было установлено, что эмульсии, содержащие масло МГД-9 обладали более высокой вязкостью, по сравнению с другими маслами, используемыми в работе.

Для анализа статистических данных использовался дисперсионный метод анализа ANOVA. Дисперсионный метод анализа с повторными

измерениями не выявил влияния на вязкость фактора А «эмульгатор» ($F=2,25$, $P=0,1045$ (рис. 21)) и выявил влияние фактора В «масло» ($F=25,80$, $P=0,0000$ (рис. 22)). При совместном применении двух факторов выявили значимое совместное влияние на вязкость.

Данные имели нормальное распределение (рис.21-22).

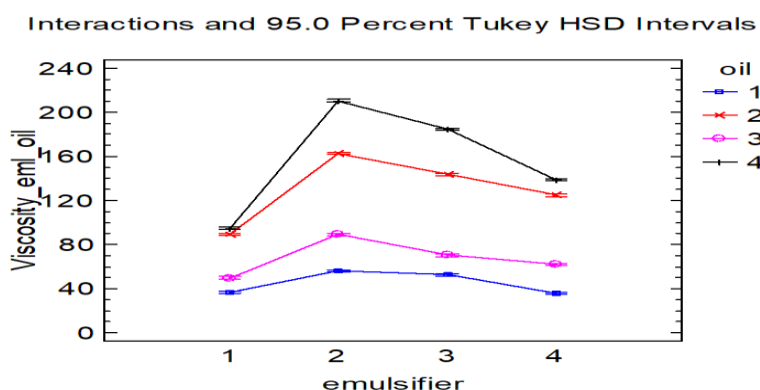


Рисунок 21 - Влияние фактора А «эмульгатор» на вязкость системы

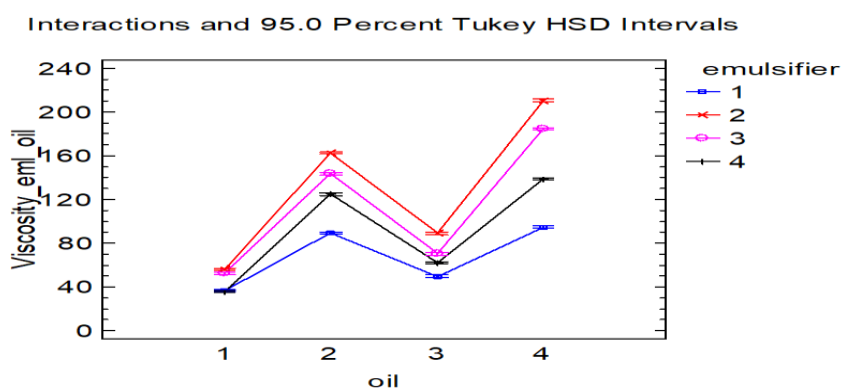


Рисунок 22 - Влияние фактора В «масло» на вязкость эмульсии

Стабильность эмульсий определяли после центрифугирования. Стабильными считали образцы, внешний вид которых не менялся в процессе визуального контроля. Кроме того, была определена стабильность образцов эмульсий хранившихся при температуре $5\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 12 месяцев, при температуре $37\pm 2^\circ\text{C}$ и $18\pm 2^\circ\text{C}$, в течение 10 дней [127]. При определении

стабильности эмульсионных вакцин наблюдали за отслоением следующих фракций:

М – прозрачное масло в верхней фракции;

В – отслоение водной фракции в нижней части пробирки;

Э – плотная эмульсия.

Результаты определения стабильности эмульсий представлены в таблицах 24-26.

Таблица 24 - Влияния марки масла на стабильность эмульсии при температуре $37\pm 2^\circ\text{C}$ (срок наблюдения 10 суток)

Эмульгаторы	Rajol WP 60			MX-150			МГД-9			SN-80		
	Высота расслоившейся фракции, мм											
	М	В	Э	М	В	Э	М	В	Э	М	В	Э
Олеат ПЭГ-Твин-80	3,5	1,0	-	6,3	1,0	-		4,8	4,1	7,4	1,0	
Манитоламоноолеат-Твин-80	0,5	-	-	4,8		-	14,8	-	-	10,3		
Сорбитанаолеат-Твин-80	1,6		-	3,5		-		5,4	7,2	2,5	0,5	
Моноолеат стеариновой кислоты-Твин-80	6,3		-	1,0	2,1	-	11,0		-		3,2	5,9

Таблица 25 - Влияния марки масла на стабильность эмульсии при температуре $18\pm 2^\circ\text{C}$ (срок наблюдения 10 суток)

Эмульгаторы	Rajol WP 60			MX-150			МГД-9			SN-80		
	Высота расслоившейся фракции, мм											
	М	В	Э	М	В	Э	М	В	Э	М	В	Э
Олеат ПЭГ-Твин-80	0,5	-	-	4,2	1,0	-	-	5,2	4,3	5,5	1,2	-
Манитол моноолеат-Твин-80	-	-	-	4,0	-	-	11,2	-	-	9,3	-	-
Сорбитанаолеат-Твин-80	0,7	-	-	2,5	-	-	-	6,4	1,4	-	6,1	-
Моноолеат стеариновой кислоты-Твин-80	4,8	-	-	0,3	-	-	13,4	-	-	-	7,0	-

Таблица 26 - Влияния марки масла на стабильность эмульсии при температуре $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ (срок наблюдения 12 месяцев)

Эмульгаторы	Rajol WP 60			MX-150			МГД-9			SN-80		
	Высота расслоившейся фракции, мм											
	М	В	Э	М	В	Э	М	В	Э	М	В	Э
Олеат ПЭГ-Твин-80	0,8	1,0	-	4,2	1,0	-	-	3,8	2,3	14		-
Манитол моноолеат-Твин-80	0,3	-	-	2,8	-	-	10,5	-	-	8,8	1,0	-
Сорбитанаолеат-Твин-80	0,7	-	-	6,9	-	-	-	4,8	3,4	-	5,5	-
Моноолеат стеариновой кислоты-Твин-80	0,5	1,0	-	0,5	-	-	13,2	-	-	-	7,1	-

Согласно полученным данным, наиболее стабильными оказались образцы, изготовленные на основе масел Rajol WP60 и MX-150. В качестве смеси эмульгаторов выбраны комбинации манитол моноолеат - Твин 80 и сорбитан олеат - Твин-80.

На основании проведённых экспериментальных исследований, разработаны 4 адьювантные композиции, следующих составов (табл.27):

Таблица 27 – Образцы адьювантных композиций

№	Состав на 100,0	
1.	Масло Rajol WP 60	89,0
	Манитол моноолеат	9,0
	Твин-80	2,0
2.	Масло MX-150	89,0
	Манитол моноолеат	9,0
	Твин-80	2,0
3.	Масло Rajol WP 60	89,0
	Сорбитан олеат	9,0
	Твин-80	2,0
4.	Масло MX-150	89,0
	Сорбитан олеат	9,0
	Твин-80	2,0

3.4 Исследование влияния комбинации антиген – масляный адьювант на стабильность опытных образцов эмульсионной вакцины

Проведенные исследования (в разделе 3.1-.3.3), позволили провести подбор соотношения масляного адьюванта и антигена.

При изготовлении стабильной эмульсии типа «вода-масло» было изучено влияние соотношения гидрофильной фазы (вирусного отлива) и липофильной фазы (масляного адьюванта) на стабильность и вязкость эмульсионной вакцины [6, 15, 144, 149]. Составление опытных образцов вакцины, проводили эмульгированием с различными объемами масляных адьювантов, используя в работе гомогенизатор DG-360 (Глава 2. Раздел 2.2.2.2).

Образцы № 1- 4, описанные в таблице 27 готовили в соотношении антиген-адъювант - 20:80, 30:70, 40:60 и 50:50, используемые в производстве некоторых вакцин в ветеринарной практике.

Оценка соответствующих физико-химических свойств полученных вакцинных препаратов, проводилась при изучении стабильности течение 12 месяцев хранения.

Согласно ОФС. 1.8.1.0002.15 «Иммунобиологические лекарственные препараты», условия хранения должны обеспечивать сохранность всех свойств препарата на протяжении регламентированного срока его годности. Температурный режим хранения, как правило, должен находиться в пределах от 2 до 8°С, если в НД нет других указаний [32].

Наблюдение при хранении 2-8° С, в условиях холодильных камер, осуществляли в течение 12 месяцев. Результаты представлены в таблице 28. Таблица 28 - Результаты определения основных характеристик качества образцов эмульсий в зависимости от соотношения фаз, после 12 месяцев хранения (n=3)

Образец 1

Процентное соотношение антиген : адъювант	Среднее значение вязкости, мм ² /с	Стабильность, мм ³
20 : 80	142,6	>10
30 : 70	74,5	4,1
40 : 60	40,2	1,0

Образец 2

Процентное соотношение антиген : адъювант	Среднее значение вязкости, мм ² /с	Стабильность, мм ³
20 : 80	137,3	>10
30 : 70	79,8	>10
40 : 60	58,4	3,0
50 : 50	64,3	>10

Образец 3

Процентное соотношение фаз антиген : адъювант	Среднее значение вязкости, мм ² /с	Стабильность, мм ³
20 : 80	162,7	>10
30 : 70	81,5	6,0
40 : 60	54,2	1,5
50 : 50	62,3	>10

Образец 4

Процентное соотношение фаз антиген : адъювант	Среднее значение вязкости, мм ² /с	Стабильность, мм ³
20 : 80	151,0	>10
30 : 70	90,2	>10
40 : 60	73,1	6,9
50 : 50	68,2	>10

В результате проведенных исследований установлено, что оптимальными для практического применения физическими свойствами обладали образцы с соотношением антигена и адъюванта 40:60. Полученные образцы эмульсий оставались стабильными, отслоение масляной фазы не превышало допустимых 10 мм³ (ГОСТ 33821-2016), вязкость незначительно увеличивалась от значений полученных при изготовлении вакцины, при этом соответствовала требованиям и установленным нормам не более 200 мм²/с.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Проведено исследование фармако-технологических и физико-химических свойств 18 разработанных образцов масляных адьювантов с различными неионогенными эмульгаторами.
2. Оценка внешнего вида эмульсий, полученных на основе разработанных образцов проведена сразу после диспергирования и гомогенизации; после центрифугирования в течение 30 минут; спустя 10 суток хранения при $t+3-5\text{ }^{\circ}\text{C}$
3. Установлено, что 6 образцов, содержащих эмульгаторы глицерол олеат с аэросилом, манитол олеат с аэросилом + твин-80, олеат ПЭГ-200, ТЭА, диэтиленгликоль моноолеат с Твин-80 (№ 2, 4, 7, 9, 11, 15), не образовывали стабильных эмульсий. Образцы № 1, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 13, 16, 17, 18 соответствовали требованию ОФС «Эмульсии», сразу после гомогенизации, однако, после центрифугирования в образцах содержащих эмульгаторы Ламесофт, Планта М, триэтиленгликоль моноолеат и Твин-80 с наноалмазами (№ 13, 16, 17, 18) наблюдались недопустимые фазовые расслоения эмульсий.
4. Наблюдение за образцами после центрифугирования в течение 30 минут показало, что в 4 образцах, содержащих глицерололеат с Твин-80, манитол моноолеат с Твин-80, олеат ПЭГ с ланолином и сорбитан олеат с Твин-80 и наноалмазами (№ 1, 3, 6, 10), соответствовали показателям качества эмульсионных вакцин, отделение в верхней части флакона слоя прозрачного масла высотой не превышало 10 мм^3 .
5. Выявлено, что эмульгаторы манитол моноолеат, олеат ПЭГ, сорбитан олеат и моноолеат стеариновой кислоты в составе масляных адьювантов образовывали стабильные эмульсии (образцы № 3, 5, 8, 14).
6. Доказана совместимость и синергическая активность твин-80 с неионогенными эмульгаторами: манитол моноолеатом, олеатом ПЭГ, сорбитан олеатом и моноолеатом стеариновой кислоты. Установлено, что

содержание Твин-80 в количестве 2% обеспечивает оптимальную вязкость и повышает стабильность эмульсий.

7. Определено влияние количественного содержания масла и смеси эмульгаторов на основные показатели качества готового продукта: образцы масляных адьювантов с содержанием масла 89%, Твин-80 - 2% и соэмульгаторов - 9% являются более стабильными и менее вязкими.
8. Определены и обоснованы критерии подбора минеральных масел по физико-химическим показателям, отвечающие требованиям для получения масляных адьювантов. Оптимальными оказались масла марок: Rajol WP60, MX-150, SN-80 и МГД-9.
9. Установлено, что эмульсии, содержащие масло МГД-9 обладали более высокой вязкостью, а эмульсии, содержащие масло SN-80 менее стабильны при температуре 2-8°C в течение 12 месяцев, при температуре 37°C и 20°C, в течение 10 дней.
10. Установлено, что выраженный реактогенный эффект проявляет масло «Янос» и масло МГД-9. Слабой реактогенностью обладает масло MX-150, масло Rajol WP60 имеет отрицательный коэффициент реактогенности.
11. Установлено, что стабильные эмульсии образованы адьювантными композициями, изготовленные на основе масел RajolWP60 и MX-150. В качестве смеси эмульгаторов выбраны комбинации манитол мноолеат - Твин 80 и сорбитан олеат - Твин-80.
12. Установлено, что оптимальными для практического применения физическими свойствами обладали образцы с соотношением антигена и адьюванта 40:60.
13. Использование метода дисперсионного анализа ANOVA и критерия Тьюки, позволило оценить влияние изучаемых факторов (концентрация эмульгаторов и состав эмульсии) на стабильность и вязкость эмульсий, которые показали статистически значимые различия и обеспечили анализ полученных экспериментальных данных с минимизацией статистических ошибок.

ГЛАВА 4 КОНСТРУИРОВАНИЕ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬСИОННОЙ ВАКЦИНЫ

На основании проведённых исследований, изложенных в главе 3, обоснованы и предложены составы адьювантных композиций, которые обеспечивают стабильность и повышают эффективность инактивированной эмульсионной вакцины.

№1	Масло RajolWP60	89,0
	Манитол моноолеат	9,0
	Твин-80	2,0
№2	Масло MX-150	89,0
	Манитол моноолеат	9,0
	Твин-80	2,0
№3	Масло RajolWP60	89,0
	Сорбитан олеат	9,0
	Твин-80	2,0
№4	Масло MX-150	89,0
	Сорбитан олеат	9,0
	Твин-80	2,0

Полученные в главе 3 результаты, послужили основанием разработки технологии эмульсионной вакцины и проведения сравнительной оценки вакцин, полученных с использованием разных адьювантов.

Дизайн проведенных исследований по разработке технологии инактивированной эмульсионной вакцины против гриппа птиц типа А подтипа H5 представлен на рисунке 23.



Рисунок 23 – Дизайн технологии инактивированной эмульсионной вакцины против гриппа птиц типа А подтипа H5N1

В соответствии с поставленными задачами, глава 4 посвящена выбору оптимальных технологических приёмов (скорость, время и режимы гомогенизации), позволяющих получить вакцину против вируса гриппа типа А подтипа Н5, представляющую собой стабильный при хранении, эффективный и безопасный препарат.

4.1 Оценка влияния технологических приёмов на основные показатели качества эмульсионной вакцины

Для изготовления опытных образцов эмульсионной вакцины использовали вирусный отлив гриппа птиц типа А подтип Н5 инактивированный формалином (Глава 2, раздел 2.1.1).

Полученные масляные адьюванты стерилизовали одним из методов:

- *термическим методом*

в вакуумном стерилизаторе при температуре 120° С – 40 минут,

- *стерилизующей фильтрацией*

с помощью шприцевого фильтра с нейлоновой мембраной фирмы Merck (Millipore Sigma-Aldrich, Supelco).

В соответствие с результатами, представленными в главе 3, образцы эмульсий готовили в соотношении антиген-адьювант - 40:60 масс%, используя погружной гомогенизатор DG-360 и проточный гомогенизатор Megatron MT 3100 S2.

Эффективность смешивания в гомогенизаторе зависела от таких факторов как температура, время гомогенизации и скорость перемешивания. Для определения оптимальных условий гомогенизации эмульсии изменяли параметры времени и скорости перемешивания. Согласно теории эмульгирования при изготовлении эмульсии необходимым условием является образование корпуса эмульсии (грубая эмульсия, предэмульсия) механическим путем, как правило, на небольших оборотах лопастей (80-500 об/мин). С целью получения мелкодисперсной эмульсии, в дальнейшем

предэмульсию диспергируют на более высоких скоростях [117, 135]. На производстве используют высокоскоростной гомогенизатор с мощностью от 1000 до 20 000 об/мин, или облучают ультразвуком

Изготовление эмульсионной вакцины проводили в две стадии

1 стадия

Получение промежуточного продукта (предэмульсии)

2 стадия

Изготовление эмульсии.

На стадии получения предэмульсии в реактор гомогенизатора со стерильным масляным адьювантом (состав 1, 2, 3, или 4) при включенной мешалке (300-500 об/мин) подавали необходимое количество антигенного материала (вирусный отлив) со скоростью 100-110 л/час. После подачи антигена в масляный адьювант смесь перемешивали с той же скоростью в течение 60 минут.

Температуру смеси поддерживали в пределах комнатной температуры от 15 до 25°C [32].

Далее эмульгирование смеси проводили, постепенно увеличивая скорость перемешивания от 1000 об./мин. до 8000 об./мин., гомогенизируя от 5 до 40 минут до получения однородной эмульсии белого цвета.

Качество образовавшейся эмульсии оценивали по внешнему виду (визуальный контроль), наблюдение проводили в течение 24 часов.

Результаты визуального контроля представлены в таблице 29.

Таблица 29 - Определение оптимальных условий гомогенизации эмульсионной вакцины

№	Скорость, об/мин	Время, мин	Результат
1.	1000	5	Эмульсии не однородны, на дне остаются не смешавшиеся компоненты препарата.
		20	Эмульсии не однородны, по истечении 20 минут наблюдается расслоение состава.
		30	Эмульсии однородны, но по истечении 50 минут наблюдается частичное расслоение.
		40	Эмульсии однородны в течение 3 часов, после образуется расслаивание на 3 кольца.
2.	2000	5	Эмульсии не однородны.
		20	Эмульсии не однородны.
		30	Эмульсии не однородны
		40	Эмульсии однородны в течение 18 часов.
3.	4000	5	Эмульсии не однородны.
		20	Эмульсии не однородны.
		30	Эмульсии однородны в течение 18 часов.
		40	Эмульсии однородны в течение 20 часов.
4.	6000	5	Эмульсии не однородны.
		20	Эмульсии не однородны, в течение 24 часов хранения, появляется кольцо преципитации.
		30	Эмульсии однородны, но в течение 24 часов, появление расслоения в верхней части пробирки.
		40	Эмульсии однородны, состав остается гомогенным.
5.	8000	5	Эмульсии не однородны.
		20	Эмульсии однородны в течение 24 часов.
		30	Эмульсии однородны в течение 24 часов
		40	Эмульсии однородны в течение 24 часов

В результате проведенного анализа установлено, что при увеличении скорости гомогенизации до 1000 об./мин с интервалом времени 5-20 мин – наблюдалось расслоение во всем объеме смеси. При гомогенизации вакцины в промежутке времени 5-20 мин, со скоростью вращения 1000-4000 об./мин,

эмульсии оставались не однородными с видимыми участками фазового расслоения. Наиболее оптимальными условиями гомогенизации, при которой эмульсия оставалась однородной и внешне гомогенной, являлась скорость 6000-8000 об/мин, с заданным интервалом времени 20-40 мин.

На основании полученных результатов, мы посчитали возможным проводить гомогенизацию при комнатной температуре от 15 до 25°C со скоростью 8000 об/мин, в течение 30 минут так как дальнейшее увеличение времени и числа оборотов лишь незначительно повышало стабильность эмульсии, но при этом значительно росли затраты энергии на диспергирование и гомогенизацию.

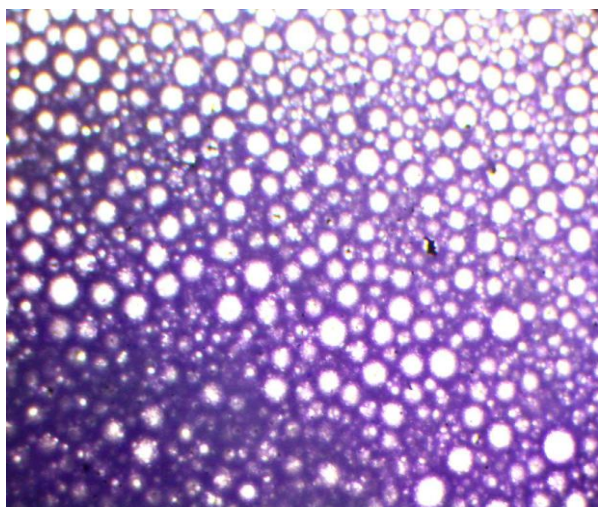
После окончания гомогенизации из реактора отбирали пробу вакцины, выдерживали ее в течение суток и проводили контроль физических параметров эмульсии: тип эмульсии, размер частиц, pH, вязкость и коллоидную стабильность в соответствии с ГФ РФ, по методикам, описанным в главе 2, разделе 2.2.

4.2 Определение типа эмульсии

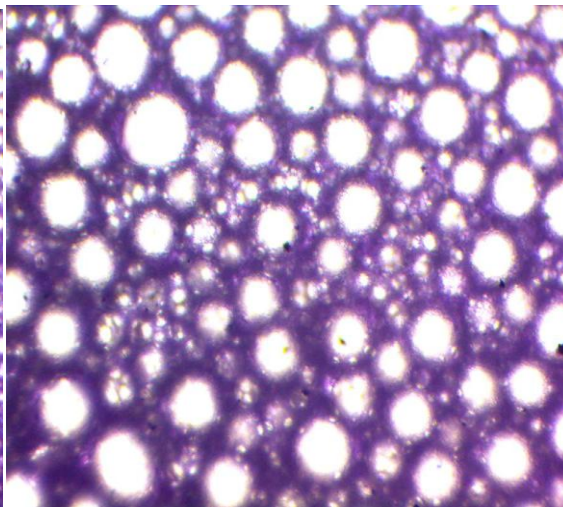
Тип эмульсии является основным параметром, который необходимо учитывать при фармацевтической разработке эмульсионных вакцин, так как именно эмульсии обратного типа («вода-масло») эффективны благодаря механизму медленного высвобождения антигена из масляной дисперсионной среды [13, 16].

Для оценки возможных рисков и потенциального влияния типа эмульсии на технологические и фармакологические свойства вакцины, были проведены их микроскопические исследования и определен тип эмульсии полученных образцов вакцин по методике, описанный в разделе 2.2.3. Для этого к небольшому количеству эмульсии добавляли краситель, растворимый в одной из жидкостей. В качестве красителей были использованы: метиленовый синий (гидрофильный) и фуксин (гидрофобный). Под

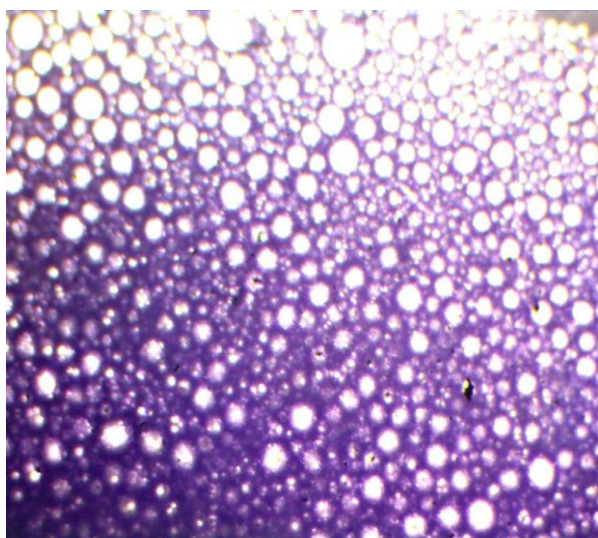
микроскопом наблюдали окрашивание либо капелек фазы, либо дисперсионной среды. Результаты представлены на рисунке 24.



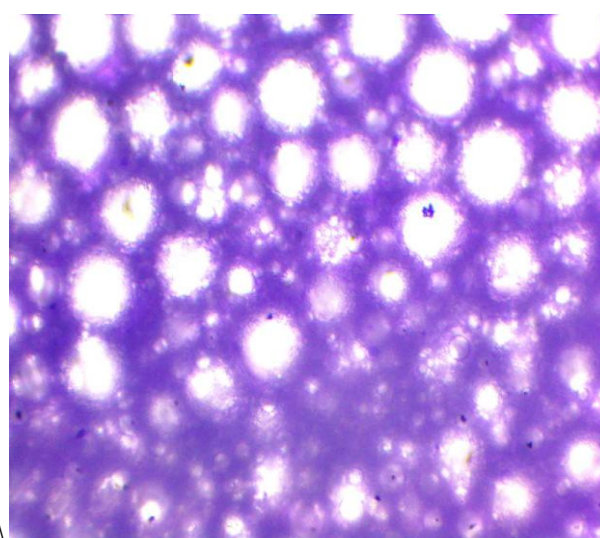
№1



№2



№ 3



№4

Рисунок 24 - Результаты определения типа эмульсии, полученных образцов эмульсионных вакцин (составы № 1- 4)

Примечание: гидрофильный краситель окрасил водную фазу эмульсии, оставив неокрашенными капли масляной дисперсионной среды

На рисунке 24 видно, что исследуемые образцы № 1, 2, 3,4 относятся к обратному типу эмульсии: «вода - масло» (В/М), так как гидрофильный краситель окрасил водную фазу эмульсии, оставив неокрашенными капли масляной дисперсионной среды.

Для достоверности исследования, полученные результаты подтверждали проведением дополнительного определения типа эмульсии капельным методом. В отмеренное количество воды добавляли несколько капель исследуемых образцов эмульсионных вакцин и наблюдали за поведением капель в гидрофильной среде. Капли эмульсий не растворялись в воде, а плавали в виде отдельных масляных капель на поверхности, что характеризовало тип эмульсии «вода-масло».

4.3 Контроль дисперсионного состава инактивированных эмульсионных вакцин

Существует взаимосвязь между продолжительностью иммунного ответа при использовании эмульсионных вакцин обратного типа и размерами частиц вирусного антигена. Размеры капель дисперсной фазы эмульсии не должны превышать 5 мкм, чем больше дисперсность раствора антигена, тем более выражен иммунный ответ. При использовании более грубых эмульсий иммунный процесс происходит менее эффективно [20, 36, 42].

Для определения размера частиц в исследуемых образцах эмульсионных вакцин, в соответствии с методикой, описанной в главе 2 раздел 2.2.4, проведена оценка гранулометрического состава вакцин. Результаты исследования представлены на рисунке 25.

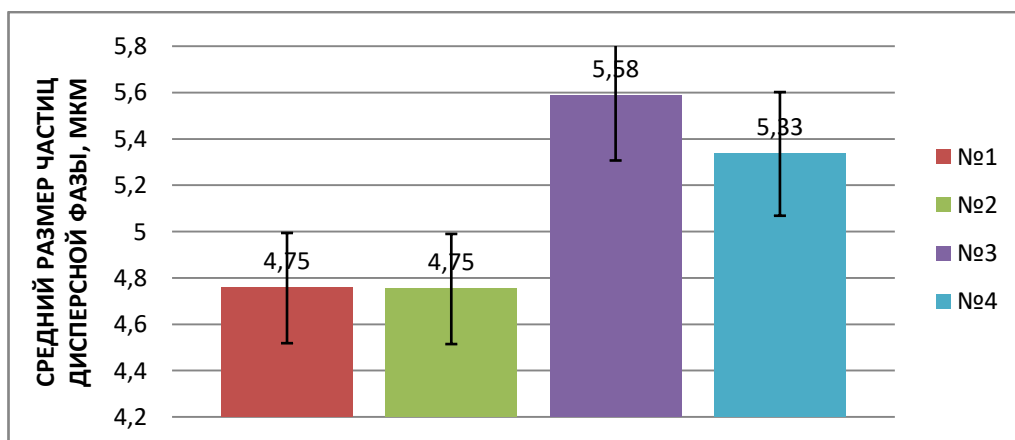


Рисунок 25 - Гранулометрический состав образцов эмульсионных вакцин

Данные по распределению частиц в исследуемых образцах эмульсионных вакцин, полученные на анализаторе «ЛАСКА - ТД», показали, что образец № 1 имеет средний размер частиц 4,757 мкм, образец № 2 имеет средний размер частиц 4,753 мкм, образец № 3 – 5,587 мкм, образец № 4 – 5,336 мкм. Таким образом, установлено, что эмульсии, полученные с помощью погружного гомогенизатора, являются грубодисперсными, что может повлиять на иммуногенную и протективную активность вакцины.

Тем не менее, существуют различные мнения о влиянии размера частиц эмульсионной вакцины на иммунитет. Имеется исследование, в котором показано, что эмульсии с размером 2–8 мкм связываются с поверхностью макрофагов и вызывают длительную и сильную выработку антител, что особенно важно при однократной вакцинации в промышленном птицеводстве [142, 147]. Также есть мнение, что для получения выраженного иммунного ответа оптимальной является смесь частиц различного размера [138]. Некоторые исследователи считают, что препараты с размером частиц эмульсии 1 мкм более доступны для захвата макрофагами и последующей презентации клеткам иммунной системы.

В связи с этим была рассмотрена возможность использования проточного гомогенизатора с целью получения микрогетерогенной эмульсии, отвечающей требованиям ОФС.1.4.2.0028 «Размер частиц (капель) и их распределение по размерам в эмульсиях для парентерального применения» [90].

Изготовление образцов эмульсий проводили в условиях, описанных выше (раздел 4.1) . Результаты определения степени дисперсности частиц в полученных образцах эмульсий представлены на рисунке 26 и свидетельствуют о том, что использование проточного гомогенизатора, позволяет получить микрогетерогенные эмульсии с размером частиц не превышающих, 1,25 мкм.

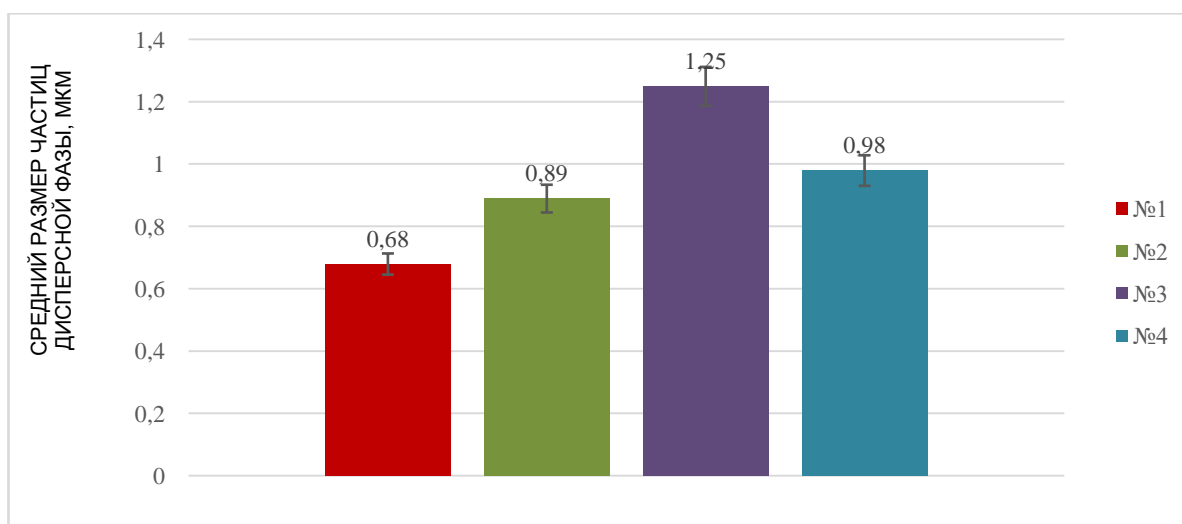


Рисунок 26 – Гранулометрический состав образцов эмульсионных вакцин № 1-4, после интенсификации диспергирования проточным гомогенизатором Megatron MT 31002

Таким образом, полученные 4 образца вакцин соответствуют требованиям нормативной документации [15, 23] и могут быть использованы для проведения фармакологических исследований на лабораторных и естественно-восприимчивых животных, с целью определения антигенной активности.

4.4 Определение стерильности эмульсионных вакцин

Испытание на стерильность исследуемых образцов эмульсионных вакцин проводили в асептических условиях в ламинарных установках согласно методике прямого посева на питательные среды, представленной в ОФС 1.2.4.003.15 «Стерильность» и ГОСТ 28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности» [23, 84]. Посевы инкубировали в течение 14 суток. Результаты контроля перед закладкой на хранение и в течение 18 месяцев хранения представлены в таблице 30.

В посевах из всех исследуемых образцов эмульсионной вакцины рост грибковой и бактериальной микрофлоры отсутствовал, следовательно, полученные образцы вакцины против гриппа птиц стерильны.

Таблица 30 – Результаты определения стерильности эмульсионных вакцин

Питательные среды	Срок наблюдения, месяцы	Наличие роста микрофлоры в образцах вакцин			
		№1	№2	№3	№4
Тиогликолевая среда	0	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	9	-	-	-	-
	12	-	-	-	-
	15	-	-	-	-
	18	-	-	-	-
Жидкая среда Сабуро	0	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	9	-	-	-	-
	12	-	-	-	-
	15	-	-	-	-
	18	-	-	-	-

**Примечание.* (-) - отсутствует рост микрофлоры

Согласно результатам, представленным в таблице 30, в посевах исследуемых образцов эмульсионной вакцины рост грибковой (*Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) и бактериальной микрофлоры (*Clostridium sporogenes*, *Clostridium novyi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*) отсутствовал, следовательно, опытные образцы вакцины против гриппа птиц оставались стерильными в течение всего срока наблюдения.

4.5 Разработка технологической схемы производства эмульсионной вакцины против гриппа птиц типа А подтипа H5N1

На основании предварительных технологических исследований, представленных в главе 2, раздел 2.2.2.1. и в главе 4, раздел 4.1 разработаны

процессуальная и технологическая схемы производства эмульсионной инактивированной вакцины против гриппа птиц типа А подтипа H5N1.



Рисунок 27(І) - Процессуальная схема производства вакцины от птичьего гриппа

Технологическая схема включала традиционные стадии производства эмульсионных инактивированных вакцин (рис.27)

ВР 1. Подготовка производства

ВР 2. Подготовка сырья и материалов

ТП 3. Приготовление масляного адьюванта

ТП 4. Получение эмульсионной вакцины

УМО 5. Фасовка и упаковка готовой продукции.

Вирусный отлив гриппа птиц (антиген) был приготовлен в условиях ФКП «Ставропольская биофабрика» из инактивированной культуры производственного штамма вируса гриппа типа А подтипа H5N1.

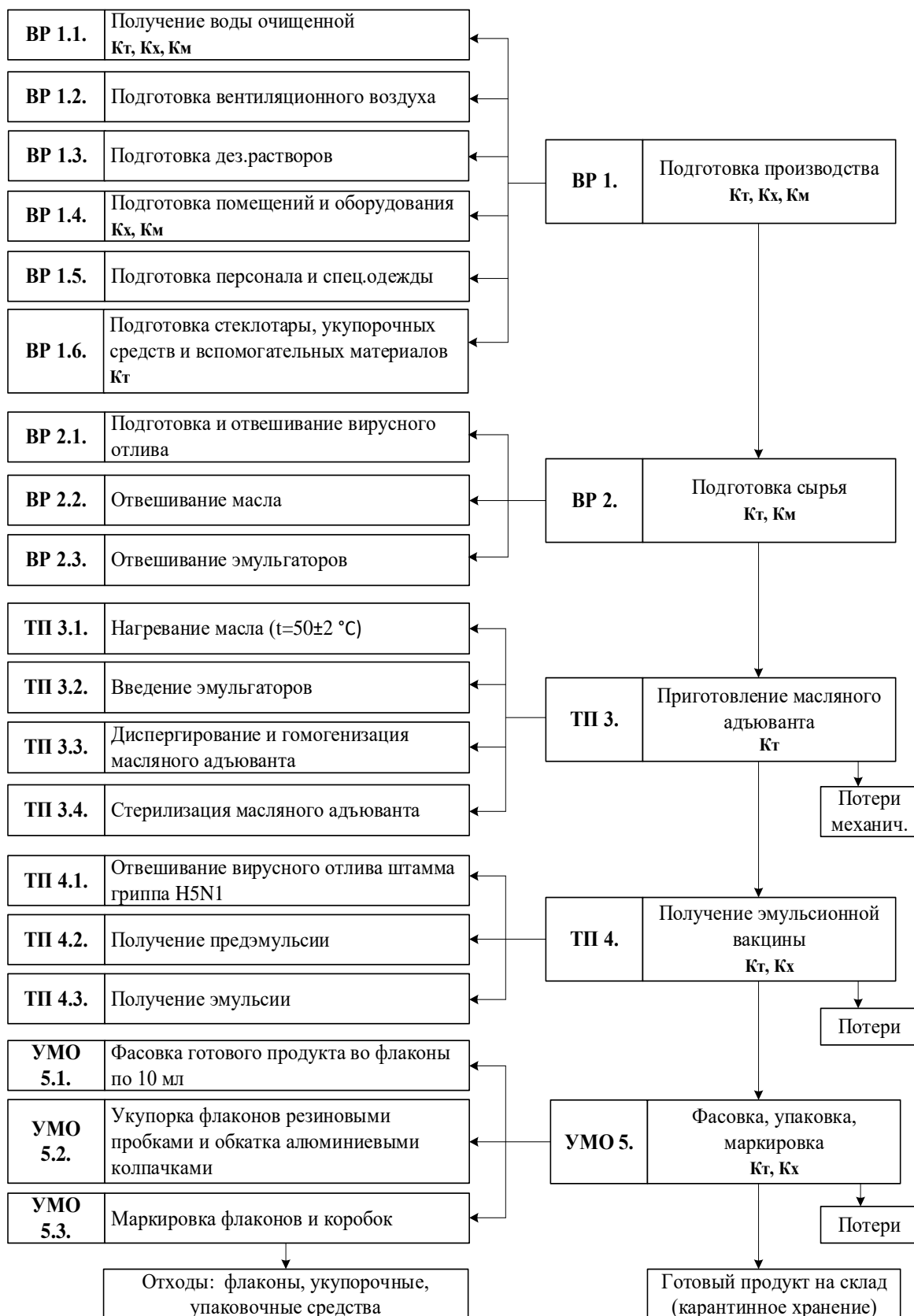


Рисунок 27(II) – Технологическая схема производства эмульсионной инактивированной вакцины против гриппа птиц типа А подтипа H5N1

Стадии ТП состояли из двух этапов.

ТП 3. - Получение масляного адьюванта

Получение масляного адьюванта проводили в стерильных условиях. Отвешенное минеральное масло помещали в обогреваемый смеситель реактора и нагревали $(50\pm 2)^\circ\text{C}$. На весах отвешивали эмульгаторы (Твин-80, сорбитан олеат, манитол моноолеат), затем эмульгаторы небольшими порциями добавляли к маслу в обогреваемый смеситель с включенной мешалкой. Смесь перемешивали 30 минут при скорости 300-500 об/мин до получения однородной массы масляного адьюванта. Готовый масляный адьювант стерилизовали.

ТП 4. – Получение эмульсионной вакцины

Антиген отвешивали на весах Demcom DA-224 и добавляли к полученному стерильному масляному адьюванту при включенной мешалке (300-500 об/мин) со скоростью 100-110 л/час. Диспергировали с той же скоростью в течение 60 минут. Температуру смеси поддерживали в пределах $18\pm 2^\circ\text{C}$.

Далее с помощью погружного гомогенизатора или проточного гомогенизатора смесь перемешивали со скоростью 8000 об./мин. в течение 30 минут до получения однородной массы белого или розоватого оттенка цвета.

УМО 5. – Фасовка, упаковка, маркировка

Фасовка готовой вакцины осуществлялась в стерильные стеклянные флаконы. Флаконы укупоривали стерильными резиновыми пробками и закатывали алюминиевыми колпачками (рис28).

На флаконы с вакциной, содержащие 10 и 20 см³ готового продукта, наклеивали этикетки с указанием:

- наименования вакцины;
- объема вакцины во флаконе, см³;
- числа доз вакцины во флаконе;
- лекарственной формы;
- номера серии;

- даты выпуска (месяца, года);
- срока годности (месяца, года);
- надписи: «Для ветеринарного применения»

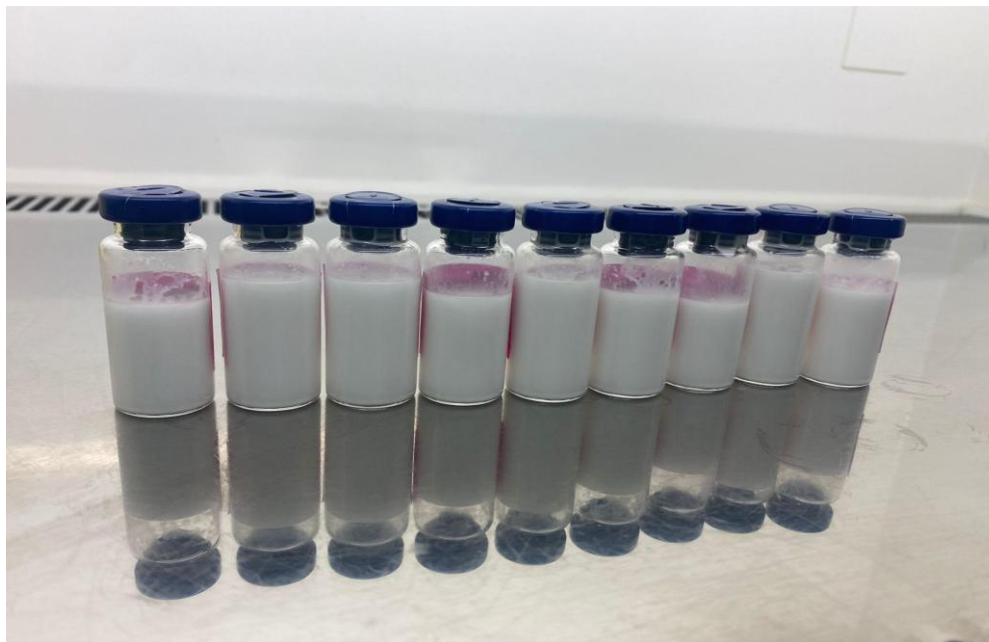


Рисунок 28 – Операции УМО - 5.1 и УМО - 5.2 технологического процесса производства инактивированной эмульсионной вакцины против гриппа птиц типа А подтипа H5N1

В технологическом процессе получения эмульсионной вакцины против вируса гриппа птиц необходимо было выделить критические точки (табл. 31), для устранения риска получения некачественного продукта.

Таблица 31 – Критические точки технологического процесса конструирования эмульсионной вакцины против птичьего гриппа типа А подтипа Н5

Наименование технологической операции	Вид контроля	Возможные риски	Способ устранения риска получения некачественного продукта
<i>1. Приготовление масляного адьюванта</i>			
1.1. Отвешивание минерального масла	Контроль массы Визуальный контроль	Технические сбои или программные ошибки, приводящие к нарушению рецептуры	Использование закрытых ёмкостей, калибровка весового оборудования перед каждой серией. Электронное ведение досье серий
1.2. Отвешивание Твин-80		Образование масляного тумана	
1.3. Отвешивание эмульгаторов (манитолмоноолеат, сорбитан олеат) 1.4.			
1.5. Смешивание при нагревании	Визуальный контроль – получение прозрачного раствора. Термоконтроль	Термическая деградация компонентов	Гомогенизация строго при температуре не выше 50°С

2.Получение эмульсии			
2.1.Приготовление предэмульсии	Визуальный контроль – получение однородной смеси белого цвета Контроль температуры процесса	Возможность нагревания смеси при диспергировании и гомогенизации	Раствор антигена добавляют медленно при включенной мешалке (300-500 об/мин) со скоростью 100-110 л/час. Смесь охлаждают подачей холодной воды в рубашку реактора
2.2. Приготовление эмульсии	Контроль массы Визуальный контроль – получение однородной смеси белого цвета. Центрифугирование Лазернаядифракционная гранулометрия, микроскопия	Риск расслоения эмульсии, образование нестабильной смеси	Для смешивания используют высокоскоростной гомогенизатор (скорость 8000 об/мин, время 30 мин., с контуром охлаждения температура 20±2°С)
3.Фасовка и упаковка эмульсионной вакцины			
3.1 Фасовка вакцины по 10 см ³ в стеклянные флаконы	Контроль объема Погрешность фасовки для 1 флакона ±5%, для 10 флаконов ±1,6% (ГОСТ33821-2016)	Механические потери	Использование современных упаковочных линий, оснащенных видеокамерами, датчиками комплектности и др
3.2 Укупорка. маркировка	Визуальный	Качество печати маркировочных стикеров	

Изучение всех этапов производственного процесса и анализ выявленных потенциальных мест возникновения рисков позволили выделить критические точки и выбрать способы устранения и контроля рисков в технологическом процессе конструирования эмульсионной вакцины.

4.6 Определение стабильности образцов эмульсионных вакцин в процессе хранения для установления сроков годности

Изучение стабильности проводилось в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.1.0009 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств», в условиях долгосрочных испытаний при температуре $(5\pm 2)^\circ\text{C}$ и влажности $(60\pm 5)\%$ в течение 18 месяцев [32]. В ходе исследований стабильности были изучены свойства эмульсионных вакцин, которые могут изменяться в процессе хранения и влиять на качество, безопасность и эффективность препарата. Перед закладкой на хранение и в процессе исследования стабильности контроль образцов проводили по некоторым показателям качества (глава 6), представленным в таблице 32.

Таблица № 32 - Показатели качества инактивированной эмульсионной вакцины против гриппа птиц типа А подтипа H5N1

Показатель качества	Метод	Норма
Описание	Визуально ГОСТ 33821-216	Однородная эмульсия белого или белого с розовым оттенком цвета. При хранении допускается незначительное расслоение эмульсии, однородность которой восстанавливается при взбалтывании
рН	Ионометрия ОФС.1.7.1.0004.15	7,0-7,6
Кинематическая вязкость	Вискозиметрия ГОСТ 33821-216 ОФС.1.2.1.0015	Не более $200 \text{ мм}^2/\text{с}$

1	2	3
Коллоидная стабильность	Центрифугирование ГОСТ 33821-216	Высота верхней прозрачной фракции, не более 10%
Стерильность	ОФС.1.2.4.0003.15	Стерильна
Описание упаковки	Стерильные стеклянные флаконы. Флаконы укупоривают стерильными резиновыми пробками и закатывают алюминиевыми колпачками.	

4.6.1 Определение концентрации водородных ионов (рН) образцов эмульсионных вакцин

С целью контроля физико-химических свойств полученных образцов эмульсионных вакцин и их стабильности, в том числе неизменности показателей безопасности и эффективности препарата от даты выпуска до окончания срока годности было проведено определение рН исследуемых образцов.

Определение концентрации водородных ионов (рН) проводили с помощью рН-метра (ОФС.1.7.1.0004.15 метод 3), при постоянной температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$. Значение рН устанавливали по трем измерениям, выводя среднее значение, допускаемые расхождения между которыми не превышали 0,1 единицы.

В дальнейшем исследование значений рН образцов вакцин проводилось в условиях долгосрочных испытаний через каждые 3, 6, 9, 12, 15 и 18 месяцев. Результаты средних значений представлены на рисунке 29.

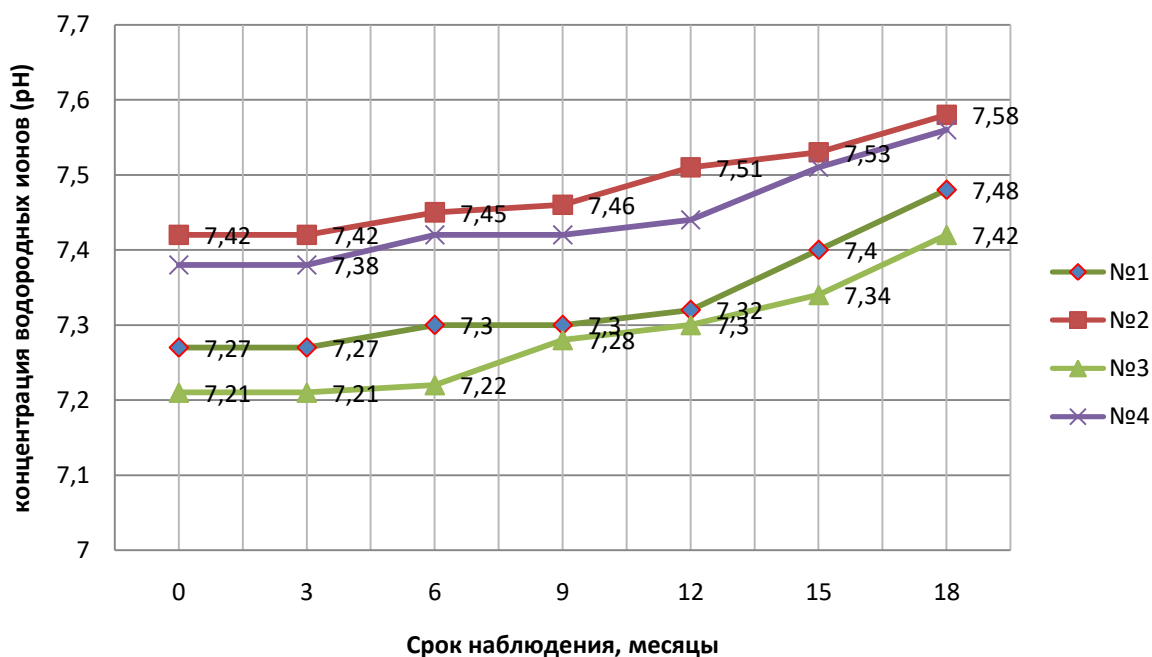


Рисунок 29 – Результаты определения концентрации водородных ионов (рН) в образцах эмульсионных вакцин

Обработка фактических значений рН с использованием инструментов дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия Тьюки позволили выявить статистически значимые изменения для состава № 1 на 15 и 18 месяцев наблюдения за величиной рН (рис.30), показатели рН в временных точках с 0-12 месяцев не имели статистически значимых различий.

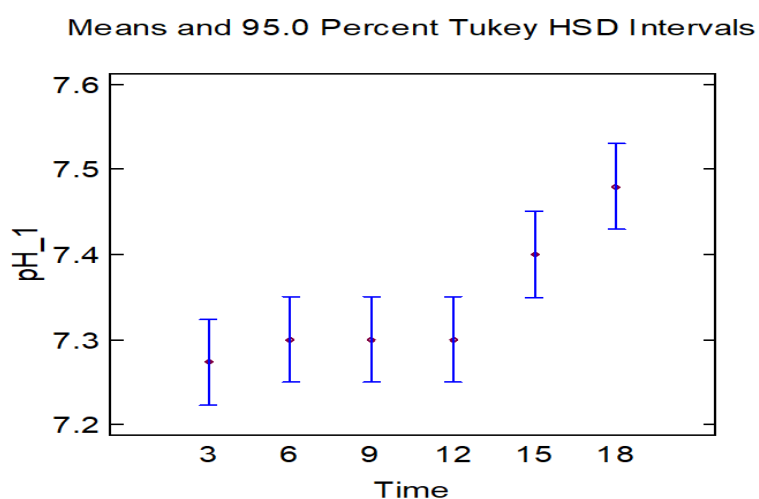


Рисунок 30 – Значения рН для образца №1 в течение 3, 6, 9, 12, 15, 18 месяцев

При сравнении полученных значений рН имеются значимые отличия через 12, 15 и 18 месяцев для состава №2 (табл. 33, 34)

Таблица 33 - Обработка значений рН с помощью дисперсионного метода анализа для образца № 2 по критерию время наблюдения

Источник	Сумма квадратов	Df	Средний квадрат	Соотношение F	P-значение
Между группами	0,052	5	0,010	13,210	0,000
Внутри групп	0,009	12	0,001		
Итого (корр.)	0,061	17			

Наблюдались значимые различия полученных данных (соотношение F). Цифровые значения, полученные методом ANOVA, позволили нам так же применить критерий Тьюки для обработки полученных значений рН.

Таблица 34 - Критерий Тьюки для значений рН - образца №2

Контраст	Sig.	Разница	+/- Лимиты
3 - 6		-0,03	0,07
3 - 9		-0,04	0,07
3 - 12	*	-0,08	0,07
3 - 15	*	-0,11	0,07
3 - 18	*	-0,16	0,07
6 - 9		-0,01	0,07

Согласно результатам, полученным в ходе эксперимента и представленным на рисунках 29-30, показатель водородных ионов полученных образцов эмульсионных вакцин через 3, 6, 9, 12, 15 и 18 месяцев

при температуре хранения $(5\pm 2)^{\circ}\text{C}$ сохранялся в пределах нормы (7,0-7,6), то есть относительно не изменился. Таким образом, полученные образцы эмульсионных вакцин могут быть использованы для проведения дальнейших исследований.

4.6.2 Определение кинематической вязкости эмульсионных вакцин

Деструктивные состояния водно-масляной системы при хранении могут явиться причиной изменения вязкости эмульсионных вакцин. В связи с этим, контроль кинематической вязкости полученных образцов эмульсионных вакцин проводили в течение 18 месяцев, каждые 3 месяца их хранения (рис. 31). Определение кинематической вязкости проводили согласно методике, описанной в главе 2, раздел 2.2.4, в трёх повторностях, с использованием капиллярного вискозиметра ВПЖ.

Исходное значение кинематической вязкости испытуемых образцов эмульсионных вакцин против гриппа птиц составила в среднем в образце №1 - $39,0\text{мм}^2/\text{с}$; образце №2 - $62,0\text{мм}^2/\text{с}$; образце №3 - $60,7\text{мм}^2/\text{с}$; образце №4 $77,3\text{мм}^2/\text{с}$, что соответствует требованиям ГОСТ 33821-2016 [43].

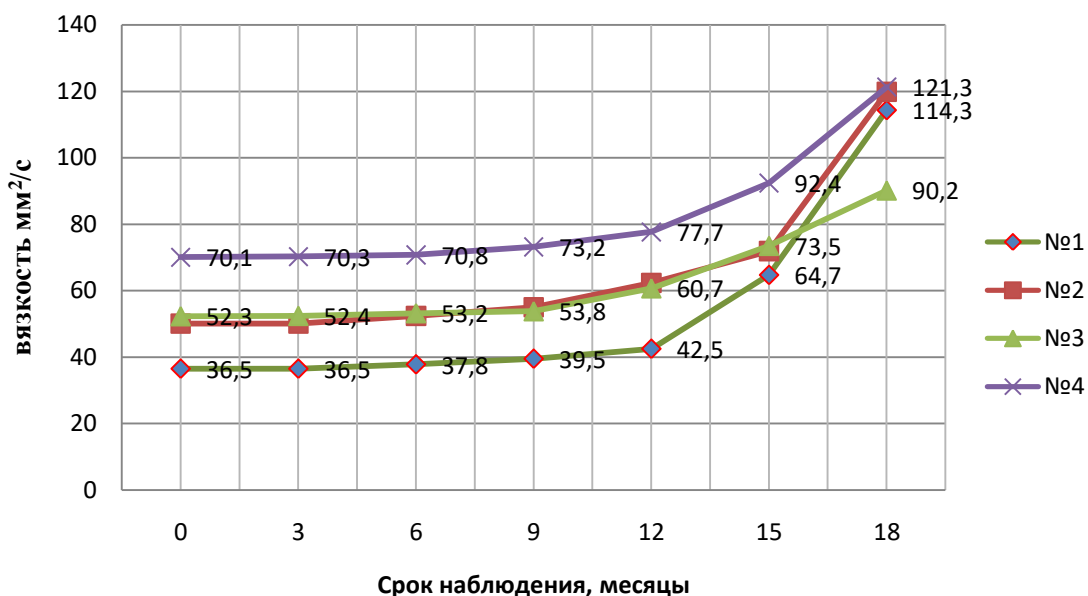


Рисунок 31 – Результаты определения кинематической вязкости в образцах эмульсионных вакцин

Как следует из данных, представленных на рисунке 31 кинематическая вязкость полученных образцов эмульсионных вакцин спустя 3, 6, 9, 12, месяцев при температуре хранения $(5\pm 2)^\circ\text{C}$ изменялась незначительно. Через 15 месяцев хранения во всех образцах эмульсионных вакцин, наблюдалось повышение вязкости, но при этом показатель сохранялся в пределах нормы (до $200 \text{ мм}^2/\text{с}$).

Для оценки статистической значимости различий данного показателя во времени (рис. 32) нами использовался дисперсионный метод анализа (табл. 35-37). Различия между другими показателями статистически незначимы и не обсуждались.

Таблица 35 - Дисперсионный метод анализа для образца №1 в течение 3, 6, 9, 12, 15, 18 месяцев

Источник	Сумма квадратов	Df	Средний квадрат	Соотношение F	P-значение
Между группами	9522,86	5	1904,57	38091,45	0,00
Внутри групп	0,60	12	0,05		
Итого (корр.)	9523,46	17			

Данные полученные методом ANOVA были обработаны с использованием апостериорного критерия Тьюки (табл. 36, рис.32).

Таблица 36 - Критерий Тьюки для образца №1 в течение 3, 6, 9, 12, 15, 18 месяцев

Контраст	Sig.	Разница	+/- Лимиты
3 - 6	*	-1,33	0,61
3 - 9	*	-2,96	0,61
3 -12	*	-6,03	0,61
3 -15	*	-28,23	0,61
3 -18	*	-63,86	0,61
6 - 9	*	-1,63	0,61

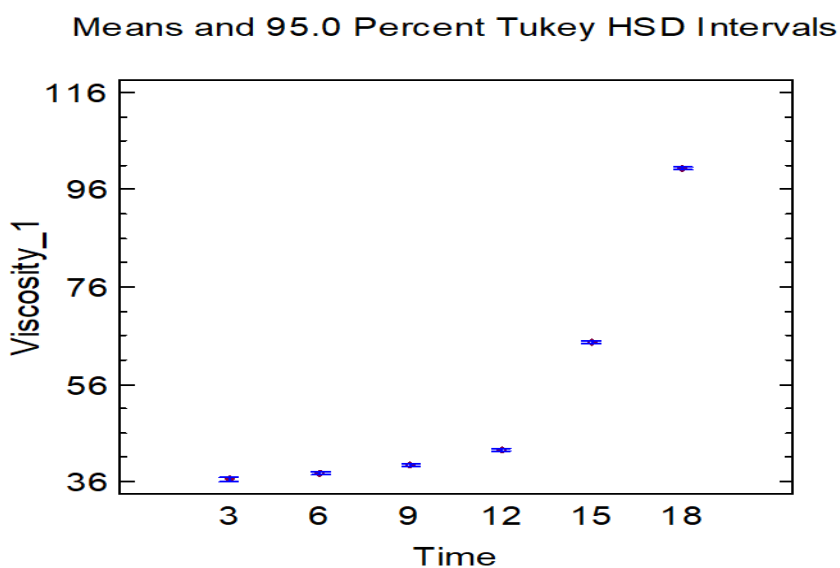


Рисунок 32 - Критерий Тьюки для образца №1 в течение 3, 6, 9, 12, 15, 18 месяцев

Интерпретация результатов обработки данных, полученных в результате обработки методом Тьюки, указывает на то, что кинематическая вязкость образца № 1 изменялась незначительно в течение 3, 6, 9, 12 месяцев, а на 15, 18 месяцах хранения значительно изменилась в сторону увеличения.

Таблица 37 - Дисперсионный метод анализа для образца №2 в течение 3, 6, 9, 12, 15, 18 месяцев

Источник	Сумма квадратов	Df	Средний квадрат	Соотношение F	P-значение
Между группами	14579,10	5	2915,81	122057,17	0,00
Внутри групп	0,28	12	0,024		
Итого (корр.)	14579,30	17			

Далее для обработки данных использовался апостериорный критерий Тьюки (табл. 38, рис. 33)

Таблица 38 - Критерий Тьюки для образца №2 в течение 3, 6, 9, 12, 15, 18 месяцев

Контраст	Sig.	Разница	+/- Лимиты
3 - 6	*	-2,1	0,4
3 - 9	*	-3,8	0,4
3 - 12	*	-5,3	0,4
3 - 15	*	-39,2	0,4
3 - 18	*	-77,4	0,4
6 - 9	*	-1,7	0,4

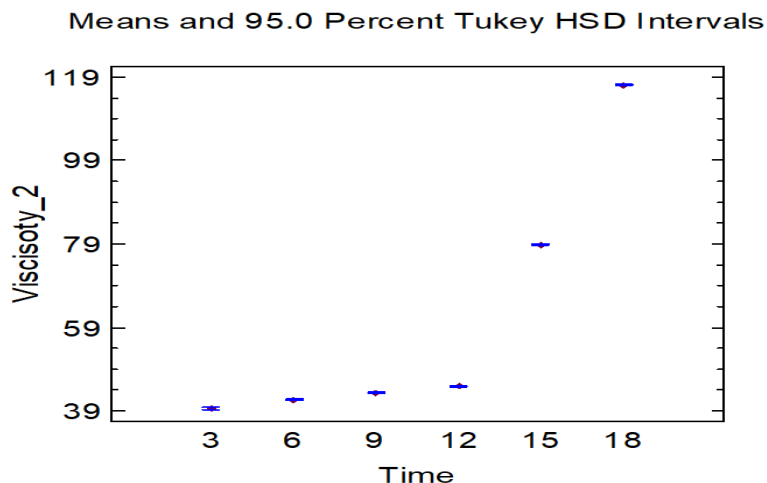


Рисунок 33 - Критерий Тьюки для образца № 2 в течении 3, 6, 9, 12, 15, 18 месяцев

Интерпретация табличных данных позволяет сделать вывод, что кинематическая вязкость образца № 2 изменялась незначительно в течение 3, 6, 9, 12 месяцев, а спустя 15, 18 месяцев хранения значительно изменилась в сторону увеличения.

4.6.3 Определение коллоидной стабильности эмульсионных вакцин

Необходимость определения коллоидной стабильности эмульсионных вакцин в условиях долгосрочного хранения связана с тем, что при длительном хранении в эмульсионных препаратах может происходить «старение», которое проявляется в слипании частиц, и как следствие нарушении однородности и потере стабильности [31, 47]. Коллоидную стабильности образцов эмульсионных вакцин определяли по методике, описанной в главе 2, разделе 2.2.4. Результаты исследований представлены на рисунке 34.

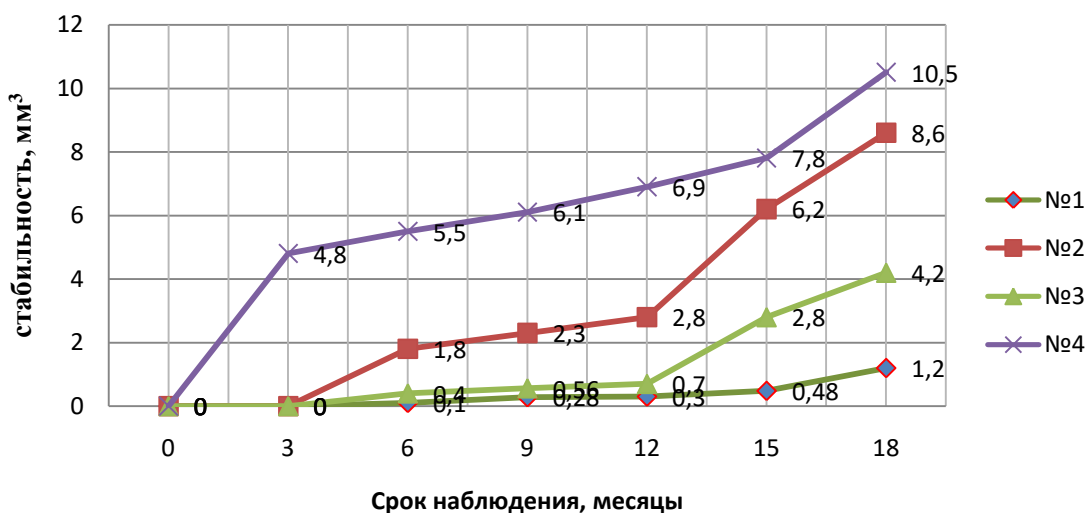


Рисунок 34– Результаты определения коллоидной стабильности в образцах эмульсионных вакцин

Результаты, свидетельствуют о стабильности эмульсионных образцов вакцины, в течение 12 месячного срока хранения. Имеющиеся частичные расслоения эмульсии, легко восстанавливались при встряхивании. При этом образцы №1 и №3 оставались стабильными в течение всего срока наблюдения. Для оценки полученных данных наиболее стабильных образцов № 1 и № 3 использовался дисперсионный метод анализа ANOVA и критерий Тьюки (табл. 39-42, рис.35-36).

Таблица 39 - Дисперсионный метод анализа данных коллоидной стабильности для образца № 1

Источник	Сумма квадратов	Df	Средний квадрат	Соотношение F	P-значение
Между группами	431,06	5	86,21	6996,51	0,00
Внутри групп	0,14	12	0,01		
Итого (корр.)	431,21	7			

Таблица 40 - Критерий Тьюки для данных, полученных после дисперсионного анализа коллоидной стабильности образца №1

Контраст	Sig.	Разница	+/- Лимиты
3 - 6	*	-0,66	0,30
3 - 9	*	-2,89	0,30
3 - 12	*	-6,19	0,30
3 - 15	*	-10,66	0,30
3 - 18	*	-12,99	0,30
6 - 9	*	-2,23	0,30

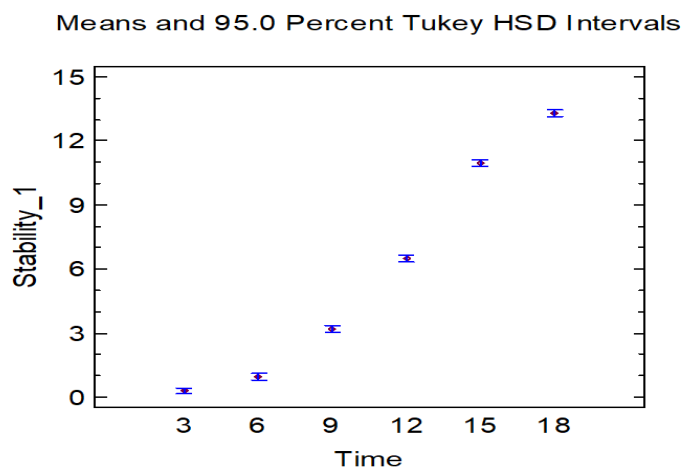


Рисунок 35 - Критерий Тьюки для данных, полученных после дисперсионного анализа коллоидной стабильности образца №1

Таблица 41 - Дисперсионный метод анализа данных коллоидной стабильности для образца №3

Источник	Сумма квадратов	Df	Средний квадрат	Соотношение F	P-значение
Между группами	672,79	5	134,56	1072,56	0,00
Внутри групп	1,51	12	0,12		
Итого (корр.)	674,29	17			

Таблица 42 - Критерий Тьюки для данных, полученных после дисперсионного анализа коллоидной стабильности образца №3

Контраст	Sig.	Разница	+/- Лимиты
3 - 6	*	-1,20	0,97
3 - 9	*	-6,80	0,97
3 - 12	*	-7,42	0,97
3 - 15	*	-12,70	0,97
3 - 18	*	-17,54	0,97
6 - 9	*	-5,59	0,97

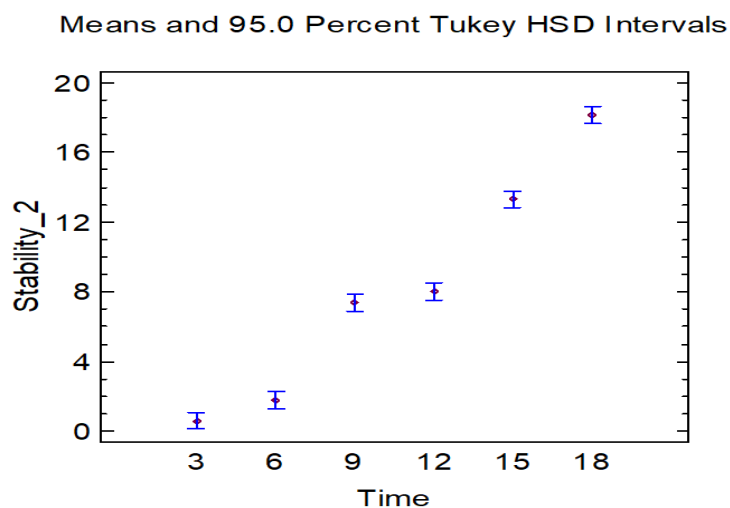


Рисунок 36 - Критерий Тьюки для данных, полученных после дисперсионного анализа коллоидной стабильности образца №3

С помощью метода ANOVA было установлено, что контролируемые факторы (стабильность и время хранения), представленные на рисунке оказывают статистически значимое влияние на коллоидную стабильность с доверительной вероятностью 95,0%. (табл. 39 и 41), поскольку Р-значения меньше 0,05.

Значения, представленные в таблицах 40 и 42, демонстрируют оценочную разницу между каждой парой средних. Знак «*» рядом с шестью парами указывает на то, что эти пары демонстрируют статистически значимые различия с доверительной вероятностью 95,0%.

Несмотря на статистически значимые различия между данными коллоидной стабильности образцов № 1 и № 3 (метод ANOVA и критерий Тьюки), полученные в процессе хранения, можно сделать вывод, что оптимальным сроком годности является 18 месяцев хранения в условиях $(5\pm 2)^{\circ}\text{C}$, так как эти данные укладываются в нормы ГОСТа. Однако для всех составов изучаемых образцов № 1 – 4 можно установить срок хранения 12 месяцев, так как, полученные значения коллоидной стабильности укладываются в нормы ГОСТа.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. Определены оптимальные условия конструирования эмульсионной вакцины, заключающиеся в изготовлении вакцины в две стадии – получении предэмульсии и собственно эмульсии.
2. С учётом технологических показателей проведён выбор оптимальных параметров гомогенизации, для создания стабильной эмульсии: стадия предэмульсии – скорость перемешивания 300-500 об/мин, время 60 минут, температура 15-25°C; стадия получения эмульсии – скорость перемешивания 6000-8000 об/мин, время 30 минут, температура 15-25°C.
3. Методом определения непрерывной фазы (метод окраски) установлен обратный тип эмульсии (В/М) полученных образцов вакцин.
4. Определение гранулометрического состава образцов эмульсионных вакцин, показало, что использование погружного гомогенизатора позволяет получить эмульсии со средним размером частиц 4,75, для получения микрогетерогенных частиц с размером менее 1 мкм необходимо использовать гомогенизатор проточного типа.
5. Установлено, что показатель водородных ионов полученных образцов эмульсионных вакцин в течение 18 месяцев наблюдения при температуре хранения $(5\pm 2)^\circ\text{C}$ сохранялся в пределах нормы (7,0-7,6).
6. Определение вязкости полученных образцов эмульсионных вакцин в течение 18 месяцев наблюдения показало повышение вязкости во всех образцах вакцин через 15 месяцев хранения, но при этом показатель сохранялся в пределах нормы (до $200 \text{ мм}^2/\text{с}$).
7. Определение коллоидной стабильности исследуемых образцов эмульсионных вакцин в процессе хранения в условиях $(5\pm 2)^\circ\text{C}$ показало, что все образцы вакцин стабильны в течение 12 месяцев.

8. На основании результатов проведенных посевов на питательные среды, установлено, что образцы эмульсионных вакцин стерильны в течение всего срока наблюдения (18 мес.)
9. Проведённое изучение стабильности в соответствии с требованиями ОФС 1.1.0009.15 в условиях долгосрочного хранения при температуре $(5\pm 2)^{\circ}\text{C}$ и влажности $(60\pm 5)\%$ в течение 18 месяцев позволило определить предполагаемый срок хранения – 12 месяцев в стерильных флаконах нейтрального стекла 10 см³, закупоренными стерильными резиновыми пробками с алюминиевыми колпачками.
10. Обоснована технологическая схема получения инактивированной эмульсионной вакцины против вируса гриппа типа А подтипа H5N1 и рассмотрены критические точки процесса производства.

ГЛАВА 5 ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬСИОННОЙ ВАКЦИНЫ

Для проведения фармакологических исследований, образцы разработанной вакцины, содержащие различные адъювантные композиции разделили на 4 группы, представленные в таблице (глава 4).

В рамках исследований полученных образцов эмульсионных вакцин согласно ГОСТу 31926-2013 изучались: безвредность, реактогенность, иммуногенная и антигенная активность препарата.

5.1 Определение безвредности образцов эмульсионных вакцин

Определение безвредности проводили на цыплятах возраста старше 25 суток, используемых для испытания птиц, отбирали только из благополучных по инфекционным болезням пунктов выращивания (виварий Ставропольской биофабрики). Формировали опытные и контрольные группы (по 10 голов) клинически здоровых животных, прошедших карантин. Тест дозу образцов вакцины вводили внутримышечно в грудную мышцу или подкожно в среднюю треть шеи мышцы птицы, в двукратной дозе объемом 1,0 см³ [23].

Наблюдение за выживаемостью цыплят вели в течение 14 суток. На первом этапе исследований был отмечен падеж двух цыплят, которым вводили образцы вакцины, изготовленные с адъювантом №4 и одного цыпленка (образец №3). Образцы вакцины № 1 и 2 для цыплят были безвредны. У всех цыплят клинических признаков болезни не обнаружено. На месте введения вакцины, при вскрытии птиц, не было выраженной воспалительной реакции. В связи с этим, для образцов вакцин № 3 и 4 опыт был проведён повторно на удвоенном количестве птиц (табл. 43).

Таблица 43 – Результаты определения безвредности экспериментальных образцов эмульсионной вакцины на цыплятах (n= 20)

Цыплята	Результаты определения					
	Номер образца эмульсионной вакцины					
	1	2	3	3 (повторно)	4	4 (повторно)
1.	жив	жив	жив	жив	жив	пал
2.	жив	жив	жив	жив	жив	пал
3.	жив	жив	жив	жив	пал	жив
4.	жив	жив	жив	жив	жив	жив
5.	жив	жив	жив	пал	жив	жив
6.	жив	жив	жив	жив	жив	жив
7.	жив	жив	жив	жив	пал	жив
8.	жив	жив	жив	жив	жив	жив
9.	жив	жив	пал	жив	жив	жив
10.	жив	жив	жив	жив	жив	жив

Результаты повторного опыта также свидетельствовали, о токсичности для цыплят экспериментальных образцов, содержащие адьювантную композицию №4. Образцы вызывали гибель до 20% птиц. Образец № 3 содержащий такую же комбинацию эмульгаторов вызывал гибель 10% цыплят. В связи с этим, образец №4 в дальнейших исследованиях не использовался.

5.2 Определение реактогенности образцов эмульсионных вакцин

Для изучения местной реактогенности образцы эмульсионных вакцин вводили цыплятам 8-10 дневного возраста внутримышечно в грудную мышцу или подкожно в среднюю треть шеи мышцы птицы в дозе 0,5см³. Через 7, 14, 21 сутки после введения образцов вакцины определяли объём образующегося отека (гл. 2 раздел 2.2.5) путем измерения длины, ширины, высоты олеогранулемы. Объем отека рассчитывали по формуле:

$$V = l \cdot b \cdot h \quad (2)$$

где l – длина, b – ширина, h – высота.

Результаты исследования реактогенности образцов эмульсионных вакцин представлены в таблице 44.

Таблица 44 - Реактогенность эмульсионных вакцин на 7, 14, 21 сутки после введения препарата

Образцы вакцины	Реактогенность, объем гранулёмы, см ³		
	7 суток	14 суток	21 сутки
№1	0,6±0,10	-	-
№2	0,8±0,15	0,3±0,16	0,2±0,10
№3	2,1±0,21	1,7±0,2	0,8±0,23
Контроль	-	-	-

Через 7 суток после введения образца №1 была обнаружена небольшая гранулёма, спустя 14 суток область введения вакцины была слегка отечна, уплотнений не прощупывалось. Через 21 сутки не обнаружено видимых изменений тканей. В месте введения образца № 2, спустя 7 суток наблюдался небольшой отёк мышечной ткани. Через 14 суток, ткани были гиперэмированы, небольшая отёчность сохранялась в течение 21 суток. Образец № 3 вызывал более выраженный отек, на месте введения на 7 и 14 сутки прощупывалось уплотнение тканей. Через 21 сутки отмечалось небольшое уплотнение ткани, отечность и гиперемия мышечной ткани.

Таким образом, по результатам проведённых исследований, наименее реактогенными были образцы вакцины № 1, № 2.

Проведены исследования реактогенности данных образцов вакцин (№ 1 и № 2) в течение 18 месяцев хранения. В процессе эксперимента оценивали постпрививочную реакцию и степень осложнения, проявляющиеся в повреждении тканей. Результаты исследований представлены в таблице 45.

Таблица 45 - Реактогенное воздействие образцов эмульсионных вакцин, в течение 18 месяцев хранения (n=3)

Образец	Время хранения	Степень повреждения тканей*			
		Без видимых повреждений	Легкая	Средняя	Тяжёлая
№ 1	1	6	4	0	0
	6	4	6	0	0
	12	3	6	1	0
	18	1	7	2	0
№ 2	1	3	7	0	0
	6	2	8	0	0
	12	0	9	1	0
	18	0	8	2	0

Примечание: * - количество птиц, у которых выявлен данный признак

Показателями степени повреждений были образование гранулём в месте введения препарата, отёчность и гиперэмия тканей. Согласно, данным представленным в таблице, в ходе исследования выявлено, что исследуемые образцы эмульсионных вакцин проявляют низкую реактогенную активность в течение 12 месяцев хранения. Более выраженная гиперэмия тканей и отёчность наблюдалась при введении препаратов со сроком годности 18 месяцев. Согласно проведенным исследованиям, можно сделать вывод о необходимости установления срока годности образцов эмульсионных вакцин, не более 12 месяцев хранения.

5.3 Определение пирогенности эмульсионных вакцин

Определение пирогенности исследуемых образцов эмульсионных вакцин проводили согласно ОФС 1.2.4.00015.15. «Пирогенность» на кроликах (термноский белый) массой 2,0-2,5 кг, из них формировали 3 группы, по 3 головы в каждой. Вакцины вводили подкожно в дозе 1см³.

1 группа – образец № 1

2 группа – образец № 2

3 группа – контрольная без введения вакцины.

Результаты исследования представлены в таблице 46.

Таблица 46 – Результаты определения пирогенности исследуемых образцов эмульсионных вакцин (n=3)

Номер группы	Температура тела, до введения	Средняя температура тела после введения вакцины (°C)										ΔТ, °C
		Время наблюдения, час										
		0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	
1	38,9	39,2	39,0	38,8	38,8	39,2	39,1	38,8	38,9	39,2	39,1	0,2
2	39,1	39,3	38,8	39,2	38,7	38,9	39,2	39,3	38,8	39,2	39,4	0,3
3	39,2	39,0	38,8	39,0	39,2	38,9	39,0	38,8	39,1	39,0	39,2	-

Результаты, полученные в ходе исследования и представленные в таблице 46, свидетельствуют о том, что исследуемые образцы вакцин являются апиrogenными, так как температура тела животных в среднем по группе не превышала 0,5°C.

5.4 Определение антигенной активности эмульсионных вакцин

Антигенность вакцины оценивали по уровню образования специфических антител в крови иммунизированных животных [13, 23, 41]. Постановку серологических реакций и учёт результатов проводили по общепринятым методикам (работу проводили совместно с ведущим научным сотрудником Ставропольской биофабрики Лиховцевой Е.Н.) на базе Ставропольской биофабрики.

Испытания проводили в соответствии с методикой, описанной в главе 2, раздел 22.5. Вакцину считали антигенно активной, если титр антител к вирусу гриппа в РТГА не менее чем у 90 % вакцинированных птиц был $6.0 \log_2$ (1:64) и выше (табл. 47).

Результаты эксперимента, представленные в таблице 47, свидетельствуют о том, что исследуемые образцы вакцины стимулировали выработку антител у птиц в титрах, превышающих минимальный уровень защиты. Вакцины обеспечивали 100% защиту привитых цыплят. Более высокая антигенная активность выявлена у образца № 1. У цыплят контрольной группы специфические антитела к вирусу гриппа отсутствовали.

Таблица 47 – Результаты определения антигенной активности образцов эмульсионной вакцины (n=3)

Группы птиц		Титр антител	
<i>Контрольная группа</i>	1.	-	
	2.	-	
	3.	-	
	4.	-	
	5.	-	
	6.	-	
	7.	-	
	8.	-	
	9.	-	
	10.	-	
		Образец № 1	Образец №2
<i>Опытная группа</i>	1.	8	6
	2.	8	6
	3.	8	7
	4.	8	7
	5.	7	6
	6.	7	6
	7.	8	8
	8.	7	5
	9.	8	8
	10.	7	7
Титр антител к вирусу ГП в РТГА, \log_2 не ниже $6,0 \log_2$		7,6	6,3
Доля цыплят, имеющих защитный титр, %		100%	100%

Таким образом, на основании проведённых фармакологических исследований установлено, что образец №1 в сравнении с другими исследуемыми образцами вакцин проявляет более высокую антигенную активность, вызывает низкую реактогенную реакцию, является безвредным, в связи с чем может быть рекомендован для проведения массовой вакцинации птицы.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Показано, что вакцины с адъювантным компонентом, представленным маслом Radjol в комбинации с эмульгаторами манитол моноолеат и твин-80, являются безвредными. Образец на основе комбинации Radjol и сорбитан олеат с Твин-80, вызывает 10% гибель птиц. Замена Radjol на МХ-150 увеличивает токсичность анализируемой вакцины (падеж птиц 20%).
2. Испытание реактогенности исследуемых эмульсионных вакцин показало, что испытуемые образцы, содержащие в составе адъювантной композиции манитол моноолеат в сочетании с Твин-80, были наименее реактогенны и незначительно отличались от контрольного образца.
3. Проведены исследования реактогенности образцов вакцин № 1, 2, в течение 18 месяцев хранения. Установлено, что исследуемые образцы эмульсионных вакцин проявляют низкую реактогенную активность в течение 12 месяцев хранения.
4. Установлено, что все исследуемые образцы вакцин апирогенны, так как при их введении температура тела животных в среднем не превышала 0,5 С
5. При определении антигенной активности исследуемых образцов вакцины установлено, что вакцина, полученная на основе адъювантной композиции, состоящей из масла Radjol в комбинации с эмульгаторами манитол моноолеат и Твин-80 обеспечивала 100% защиту привитых цыплят.

ГЛАВА 6 Обоснование норм качества инактивированной эмульсионной вакцины

Одним из базовых этапов внедрения лекарственного или ветеринарного препарата в производство является предоставление нормативной документации, разработанной на основе современных, объективных аналитических методов анализа. Это положение касается также и используемых уже в медицине и ветеринарии препаратов, для которых предложены более современный состав вспомогательных веществ и соответствующая технология. Для разработанной нами эмульсионной вакцины на основе предлагаемого масляного адъюванта, необходимо было пересмотреть нормы качества и методики, которые соответствовали требованиям современной нормативной документации. В виду того, что действующий ГОСТ 33821-2016 «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульгированная» был разработан в 2016 году, а требования к качеству лекарственных средств постоянно возрастают, нами были использованы и некоторые критерии, описанные в ОФС.1.7.1.0004.15 «Вакцины и анатоксины» и ФС.3.3.1.0028.20 «Вакцина гриппозная инактивированная» [27, 32, 33].

Основываясь на положениях, изложенных в ОФС 1.7.1.0004.15 и ГОСТ 33821-2016 был разработан проект нормативного документа (НД). В соответствии с ОФС 1.7.1.0004.15 использовались такие испытания рН, пирогенность, реактогенность. В испытаниях использованы 5 серий образцов, изготовленных в стерильных условиях Ставропольской Биофабрики.

6.1 Описание

На основании исследования полученных эмульсионных вакцин (раздел 4.6.) показатель качества «Описание» можно сформулировать как «Однородная эмульсия белого или белого с розовым оттенком цвета, при

хранении возможно незначительное отделение масла над нераслаивающейся эмульсией» (табл. 48).

Таблица 48 – Результаты определения показателя качества «Описание»

Серия	Результат (визуально)
Серия 1 от 01.12.2023	Однородная эмульсия белого с розовым оттенком цвета
Серия 2 от 18.12.2023	Однородная эмульсия белого цвета
Серия 3 от 25.12.2023	Однородная эмульсия белого с розовым оттенком цвета
Серия 4 от 12.01.2024	Однородная эмульсия белого цвета, после 9 месяцев хранения наблюдалось незначительное отделение масла над нераслаивающейся эмульсией
Серия 5 от 20.01.2024	Однородная эмульсия белого цвета

6.2. Концентрация водородных ионов (рН)

Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Согласно методике, описанной в ОФС, испытания проводят с неразведенным препаратом (табл. 48). Как следует из результатов проведенных испытаний, описанных в главе 4 (рис. 29) значения рН в процессе хранения могут незначительно изменяться, при этом полученные значения не превышают допустимые в соответствии с требованиями ФС.3.3.1.0028.20.

Таблица 49 – Результаты определения показателя качества «Концентрация водородных ионов (рН)»

Серия	Результат
Серия 1 от 01.12.2023	7,27±0,22
Серия 2 от 18.12.2023	7,25±0,27
Серия 3 от 25.12.2023	7,27±0,23
Серия 4 от 12.01.2024	7,26±0,20
Серия 5 от 20.01.2024	7,28±0,18

В соответствии с требованием ФС.3.3.1.0028.20 этот показатель качества должен находиться в пределах значений 7,0 -7,6, таким образом, образцы изготовленных вакцин соответствуют данному показателю.

6.3 Стерильность

Инактивированные вакцины должны быть стерильными. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» и ГОСТ 28085-2013 в асептических условиях в ламинарных установках, чистых помещений, методом прямого посева (см. Глава 2 п.2.2.3). Как следует из результатов проведенных испытаний (см. Глава 4, таб. 29) рост грибковой (*Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) и бактериальной микрофлоры (*Clostridium sporogenes*, *Clostridium novyi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*) отсутствует. В связи, с чем предложена формулировка «Рост микрофлоры отсутствует (стерильна)» и результаты определения показателя качества «Стерильность» соответствуют норме (табл. 50).

Таблица 50 – Результаты определения показателя качества «Стерильность»

Серия	Результат
Серия 1 от 01.12.2023	Рост микрофлоры отсутствует (стерильна)
Серия 2 от 18.12.2023	Рост микрофлоры отсутствует (стерильна)
Серия 3 от 25.12.2023	Рост микрофлоры отсутствует (стерильна)
Серия 4 от 12.01.2024	Рост микрофлоры отсутствует (стерильна)
Серия 5 от 20.01.2024	Рост микрофлоры отсутствует (стерильна)

Результаты определения показателя качества «Стерильность» (табл. 50), свидетельствуют о том, что все серии, полученных образцов вакцины стерильны.

6.4 Кинематическая вязкость

Испытания определения вязкости эмульсионных вакцин проводят в соответствии с ГОСТ 33821-2016 с помощью капиллярного вискозиметра ВПЖ-2 при 20° С. Кинематическая вязкость вакцины должна быть не более 200 мм²/с. Результаты исследований, описанных в главе 4 (рис. 31), свидетельствуют о том, что выбранный эмульгатор позволяет создать вакцину, показатель кинематической вязкости которой соответствует нормам, предлагаемым ГОСТ 33821-2016.

Таблица 51 – Результаты определения показателя качества «Кинематическая вязкость»

Серия	Результат, мм ² /с
Серия 1 от 01.12.2023	36,5±0,52
Серия 2 от 18.12.2023	36,7±0,48
Серия 3 от 25.12.2023	36,4±0,50
Серия 4 от 12.01.2024	36,8±0,50
Серия 5 от 20.01.2024	36,5±0,54

Результаты, определения кинематической вязкости исследуемых образцов, представленные в таблице 51, соответствуют нормам по данному показателю.

6.5 Коллоидная стабильность

На основании исследований полученных эмульсионных вакцин (Глава 4 рис. 34) и согласно ГОСТ 33821-2016 - эмульсию считают стабильной, если после центрифугирования в каждой из трех пробирок в процессе визуального контроля не обнаружено никаких изменений содержимого или если высота столба прозрачной фракции, сформировавшейся в верхней части пробирки, не превышает 10 % (10 мм)

Таблица 52 – Результаты определения показателя качества «Коллоидная стабильность»

Серия	Результат, мм		
	1 пробирка	2 пробирка	3 пробирка
Серия 1 от 01.12.2023	3	5	1
Серия 2 от 18.12.2023	-	0,2	-
Серия 3 от 25.12.2023	3	-	6
Серия 4 от 12.01.2024	-	-	5
Серия 5 от 20.01.2024	2	5	1

Результаты определения показателя качества «Коллоидная стабильность» (табл. 52), свидетельствуют о том, что высота прозрачной фракции не превышает 10% от столба эмульсии в пробирке.

6.6 Безвредность

В соответствии с ГОСТ 33821-2016 и ГОСТ 31926-2013 [23, 27] вакцину считают безвредной, если все цыплята в течение 14 суток останутся живыми, без клинических признаков болезни. Критерий по ГОСТ 33821-2016 «Должна быть безвредна». На основании исследования полученных эмульсионных вакцин (Глава 5. раздел 5.1. табл. 43) предложенная нами технология и состав позволили обеспечить показатель качества «Безвредность» и сформулировать его результат как «Отсутствуют клинические признаки болезни».

Таблица 53 – Результаты определения показателя качества «Безвредность»

Серия	Результат (поствакцинальная реакция)
Серия 1 от 01.12.2023	Отсутствуют клинические признаки болезни
Серия 2 от 18.12.2023	Отсутствуют клинические признаки болезни
Серия 3 от 25.12.2023	Отсутствуют клинические признаки болезни
Серия 4 от 12.01.2024	Отсутствуют клинические признаки болезни
Серия 5 от 20.01.2024	Отсутствуют клинические признаки болезни

Результаты определения показателя качества «Безвредность» на 5 образцах полученной вакцины (табл. 53) позволяют подтвердить безвредность вакцины.

6.7 Реактогенность

Определение проводят в соответствии с ГОСТ 31926-2013 [23]. Оценивают постпрививочную реакцию и степень осложнения, проявляющиеся в повреждении тканей при введении терапевтической дозы препарата. Как следует из результатов проведенных испытаний (Глава 5, табл. 44, 45) определение показателя качества вакцины «Реактогенность» можно описать, как «Без видимых повреждений и/или легкое покраснение или повреждение тканей» (табл. 54).

Таблица 54 – Результаты определения показателя качества «Реактогенность»

Серия	Результат (степень повреждения тканей)
Серия 1 от 01.12.2023	Без видимых повреждений
Серия 2 от 18.12.2023	Легкое повреждение тканей
Серия 3 от 25.12.2023	Легкое покраснение вокруг места инъекции
Серия 4 от 12.01.2024	Без видимых повреждений
Серия 5 от 20.01.2024	Без видимых повреждений

6.8 Антигенная активность

Определение проводят в соответствии с ГОСТ 33821-2016 на 20 цыплятах, 10 из которых являются контрольными невакцинированными. Вакцину считают антигенно-активной, если не менее чем у 90 % вакцинированных птиц титр антител к вирусу гриппа в РТГА должен быть $6.0 \log^2 (1:64)$ и выше. В контрольной группе у цыплят должны отсутствовать специфические антитела к вирусу гриппа. Как следует из проведённых результатов (Глава 5, табл. 47), полученные значения оказались не ниже допустимых в соответствии с требованиями ГОСТ 33821-2016.

Таблица 55 – Результаты определения показателя качества «Антигенная активность»

Серия	Результат (титр антител к вирусу ГПв РТГА, $\log 2$)
Серия 1 от 01.12.2023	7,8±0,17
Серия 2 от 18.12.2023	7,7±0,14
Серия 3 от 25.12.2023	8,0±0,12
Серия 4 от 12.01.2024	7,5±0,17
Серия 5 от 20.01.2024	8,0±0,15

Результаты определения показателя качества «Антигенная активность» (табл. 55) свидетельствуют о том, что все пять проверяемых образцов соответствуют предлагаемой норме (титр должен быть $6.0 \log^2 (1:64)$ и выше).

6.9 Пирогенность

Определение пирогенности проводили в соответствии с ГОСТ 31926-2013 на здоровых кроликах (не альбиносах). Испытанию подлежат все инъекционные лекарственные средства. Как следует из результатов проведенных испытаний (Глава 5, табл. 46), образцы разработанной эмульсионной вакцины являются апиrogenными, так как температура тела

животных в среднем по группе не превышала 0,5°C. В связи с этим, предложена формулировка «Вакцина апиrogenная» (табл. 56).

Таблица 56 – Результаты определения показателя качества «Пирогенность»

Серия	Температура тела кроликов, °C		
	t_{cp}^*	t_{cp}^{**}	$\Delta T_{cp}, ^\circ C$
Серия 1 от 01.12.2023	38,9	39,1	0,2
Серия 2 от 18.12.2023	39,1	39,4	0,3
Серия 3 от 25.12.2023	39,2	39,2	-
Серия 4 от 12.01.2024	39,0	39,1	0,1
Серия 5 от 20.01.2024	38,9	39,3	0,4

Примечание:

* - Среднее значение исходной температуры тела,

** - Среднее значение температуры тела, измеренной спустя 5 часов

Результаты определения пирогенности на 5 сериях образцов вакцины (табл. 56) свидетельствуют о том, что вакцина апиrogenна.

6.10 Упаковка

Фасовку/упаковку проводят согласно методике описанной в ГОСТ 33821-2016 Средства лекарственные для ветеринарного применения. Вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульгированная [27]. Вакцину расфасовывают по 10 см³ в стерильные полимерные или стеклянные флаконы. Укупоривают флаконы стерильными резиновыми пробками и закатывают алюминиевыми колпачками. Погрешность фасования составляет для одного флакона ± 5 %, для десяти флаконов ± 1,6 % (табл. 57).

Таблица 57 – Результаты определения показателя качества «Упаковка»

Серия	Измеренный объём, мл	Погрешность, %
Серия 1 от 01.12.2023	10,5	±5
Серия 2 от 18.12.2023	9,8	±2
Серия 3 от 25.12.2023	9,5	±5
Серия 4 от 12.01.2024	10,5	±5
Серия 5 от 20.01.2024	9,6	±4

Погрешность фасования для одного флакона не превышает $\pm 5\%$.

6.11 Транспортирование и хранение

В соответствии с требованиями описанными в ГОСТ 33821-2016 и санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.3.2.3332-16 «Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов» вакцину транспортируют всеми видами транспорта при температуре в пределах от $+2^{\circ}\text{C}$ до $+8^{\circ}\text{C}$ в пределах срока годности.

Срок годности вакцины — 12 месяцев с даты выпуска. Датой выпуска вакцины считают дату подписания документа о качестве.

Оценка качества инактивированной эмульсионной вакцины, на основе разработанного масляного адьюванта показала соответствие ГОСТ и фармакопейным требованиям, предъявляемым к вакцинам (табл. 58).

Таблица 58 – Проект спецификация показателей качества инактивированной эмульсионной вакцины против гриппа птиц

Определяемый показатель	Характеристика и норма
Описание	Однородная эмульсия белого или белого с розовым оттенком цвета. При хранении допускается незначительное расслоение эмульсии, однородность которой восстанавливается при взбалтывании
Стерильность	Стерильна
Коллоидная стабильность	Высота верхней прозрачной фракции, не более 10%
Кинематическая вязкость	не более 200 мм ² /с
рН	7,0-7,6
Безвредность	Отсутствуют клинические признаки болезни
Реактогенность	Мало реактогенная
Пирогенность	Апирогенная
Антигенная активность	Титр антител к вирусу гриппа птиц через 21—28 сут после иммунизации у 90 % привитых цыплят: в РТГА, log ₂ не ниже 6,0
Фасовка/упаковка	10 мл±5%
Срок хранения	12 месяцев

Примечания РТГА — реакция торможения гемагглютинации.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6

1. Разработан проект нормативного документа и спецификация показателей качества инактивированной эмульсионной вакцины против гриппа птиц, включающая: описание, pH, кинематическую вязкость, коллоидную стабильность, стерильность, пирогенность, безвредность, реактогенность, антигенную активность, упаковку, срок хранения
2. На основании исследований полученных эмульсионных вакцин сформулировано определение показателя качества «Описание» как «Однородная эмульсия белого или белого с розовым оттенком цвета, при хранении возможно незначительное отделение масла над нерастворяющейся эмульсией»
3. Установлено, что разработанные образцы вакцины соответствуют требованиям ФС.3.3.1.0028.20 по показателю pH (7,26-7,28).
4. При определении показателя качества «Стерильность» установлено в разработанных образцах вакцины отсутствие роста грибковой (*Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) и бактериальной микрофлоры (*Clostridium sporogenes*, *Clostridium novyi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*). Результаты соответствуют норме. В связи с этим, предложена формулировка «Рост микрофлоры отсутствует (стерильна)».
5. Результаты исследований определения показателей качества «Кинематическая вязкость» и «Коллоидная стабильность» соответствует норме, предлагаемой ГОСТ 33821-2016, вязкость не выше 200 мм²/с, стабильность - расслоение в верхней части флакона не превышает 10 %.
6. Установлено, что изготовленные образцы вакцины безвредны, сформулирован результат определения показателя безвредность - «Отсутствуют клинические признаки болезни».
7. В результате определения показателя качества вакцины «Реактогенность» установлено, что вакцина слабо или не реактогенна, сформулирован

результат «Без видимых повреждений и/или легкое покраснение или повреждение тканей».

8. В результате проведенных испытаний установлено, что образцы разработанной эмульсионной вакцины являются апиrogenными, предложена формулировка «Вакцина апиrogenная».
9. Показано, что в прививной дозе вакцины, в соответствии с требованиями ГОСТ 33821-2016 титр антител к вирусу гриппа в РТГА оказался выше нормы ($6.0 \log^2 (1:64)$), что обеспечивало 100%-ную защиту птиц от высокопатогенного вируса гриппа птиц типа а подтипа H5, полученные значения от 7,0 до 8,0 не ниже допустимых
10. Оценка качества инактивированной эмульсионной вакцины, на основе разработанного масляного адьюванта показала соответствие ГОСТ и фармакопейным требованиям, предъявляемым к вакцинам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На основе проведенного анализа обзора литературы установлено, что рынок иммунобиологических препаратов в России характеризуется высокой зависимостью от импорта, при этом птичий грипп H5N1 по-прежнему остается одной из главных инфекционных угроз современности, в связи, с чем обоснована актуальность создания адъювантных композиций для производства отечественных вакцин.
2. Для конструирования адъювантных композиций обоснован выбор минеральных масел и эмульгаторов. Проведено исследование фармако-технологических и физико-химических свойств 18 разработанных образцов масляных адъювантов с различными неионогенными эмульгаторами. Выявлено, что эмульгаторы манитол моноолеат, олеат ПЭГ, сорбитан олеат и моноолеат стеариновой кислоты в составе масляных адъювантов образуют стабильные эмульсии.
3. Определены и обоснованы критерии подбора оптимальных синтетических масел по физико-химическим показателям и фармакологическим свойствам. Оптимальными из выбранных оказались масла марок: Rajol WP60, MX-150, SN-80 и МГД-9, которые обладали слабой ректогенностью, низкой вязкостью и образовывали стабильные эмульсии в соотношении антигена и адъюванта 40:60.
4. Изучено влияние природы и концентрации вспомогательных веществ на основные свойства полученных эмульсий. Установлено, что эмульгаторы манитол моноолеат, олеат ПЭГ, сорбитан олеат и моноолеат стеариновой кислоты в составе масляных адъювантов образуют стабильные эмульсии. Доказана совместимость и синергическая активность неионогенных эмульгаторов с Твин-80 в количестве 2%. Определено влияние количественного содержания масла и смеси эмульгаторов на стабильность и вязкость эмульсионных вакцин, наиболее эффективные образцы масляных адъювантов с содержанием масла 89%, Твин-80 - 2% и соэмульгаторов - 9%.

Для обработки данных использовались универсальные методы (метод дисперсионного анализа ANOVA и апостериорный критерий Тьюки), которые надежны в контроле статистических ошибок.

5. Предложена оригинальная адьювантная композиция, включающая синтетическое масло Rajol и эмульгаторы манитол моноолеат с Твин-80. Разработка масляного адьюванта данного состава, позволяет отказаться от использования в производстве вакцин, дорогостоящего французского адьюванта Montanide ISA-70 (Seppic). Создание отечественного масляного адьюванта является компонентом критической инфраструктуры российского государства в группе продовольственной безопасности, и соответствуют приоритетам государственной политики в области обеспечения импортонезависимости страны.

6. В ходе разработки состава и технологии эмульсионной вакцины изучена стабильность эмульсионных препаратов в условиях долгосрочного хранения при температуре $(5\pm 2)^\circ\text{C}$ и влажности $(60\pm 5)\%$ в течение 18 месяцев, определён предполагаемый срок хранения – 12 месяцев.

7. Проведена оценка фармакологической эффективности и безопасности разрабатываемых инактивированных эмульсионных вакцин. Установлено в опытах *in vivo* на лабораторных и естественно-восприимчивых животных, что исследуемые образцы вакцин являются апиrogenными, безвредны, не проявляют реактогенных свойств и при этом обладают выраженной антигенной активностью.

8. Оценка качества инактивированной эмульсионной вакцины, на основе разработанного масляного адьюванта показала соответствие ГОСТ и фармакопейным требованиям, предъявляемым к вакцинам. Разработан проект нормативного документа и спецификация показателей качества инактивированной эмульсионной вакцины против гриппа птиц, включающая: описание, pH, кинематическую вязкость, коллоидную стабильность, стерильность, пирогенность, безвредность, реактогенность, антигенную активность, упаковку, срок хранения

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Исаенко, Е.Ю. Адъюванты в современной вакцинологии / Е.Ю. Исаенко [и др.] // *Annals of Mechnikov Institute*. – 2013. – № 4. – С. 4-21.
2. Михалишин, В.В. Адъюванты и их использование» / В.В. Михалишин, Н.С. Мамков // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных: матер. Междунар. науч. конф. «Инфекционная патология животных», посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – 2008. – Т. 6. – С. 340-371.
3. Пат. 2816851 Российская Федерация МПК А61К 39/39Б А61К 39/295, А61К 9/107, А61К 35/06. Адъюванты на масляной основе / П.Д. Доминовски, Л. Вильмес, Д.Л. Фосс, К. Мор, Г. Галло, Д.М. Хардхам, Р.Л. Кребс, С.Э.М. Лайтли, С. Махан, С. Медиратта, Д. Мванги, Ш.К. Рай, С.А. Сэлмон, Ш. Вора, М.К. Фонтэйн, Д.Д.Э. Смит, Д.Л. Фитцпатрик, У. Доначи, А.Д. Ягларж ; патентообладатель Зоэтикс Сервисиз ЛЛС. – № 2019128164 ; заявл. 19.09.2014 ; опубл. 05.04.2024, Бюл. № 10.– 3 с.
4. Курашова, С.С. Адъюванты на основе углеводов для производства вакцин / С.С. Курашова [и др.] // *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2018. – Т. 18, № 2(66). – С. 81-91.
5. Мельник, Р.Н. Анализ эффективности сложных адъювантных комплексов / Р.Н. Мельник [и др.] // *Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов: материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых*. – Лосино-Петровский: Б. и., 2022. – С. 57-65.
6. Атауллаханов, Р.И. Адъюванты в составе вакцин. Сообщение 2. Масляные эмульсии, липосомы, виросомы, археосомы, экзосомы / Р.И. Атауллаханов, Р.М. Хатов // *Иммунология*. – 2011. – Т. 32, № 2. – С. 101-109.
7. Заглядова, С.В. Белые масла – производство, требования, технологии / С.В. Заглядова [и др.] // *Масла и топлива СНГ: материалы II ежегодной Международной конференции*. – 2014.

8. Бобылева, Г.А. Экономическая эффективность ветеринарно-профилактических мероприятий в промышленном птицеводстве / Г.А. Бобылева, В.В. Гушин // Птица и птицепродукты. – 2022. – № 2. – С. 14-18.
9. Бондарев, А.Я. Высокпатогенный грипп птиц: современное состояние, распространение вируса и меры борьбы / А.Я. Бондарев, Д.М. Евстафьев // Роль аграрной науки в устойчивом развитии сельских территорий: сборник VIII Всероссийской (национальной) научной конференции с международным участием. – Новосибирск: ИЦ НГАУ «Золотой колос», 2023. – С. 331-335.
10. Борисов, В.В. Изучение антигенной активности инактивированной эмульгированной вакцины против ССЯ-76, находящейся в состоянии «Кремлинг» / В.В. Борисов [и др.] // Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных: материалы Международной научно-практической конференции. – Минск: Белорусское издательское товарищество «Хата», 2000. – С. 67-68.
11. Борисов В.В. Стратегия применения новых отечественных вакцин для профилактики вирусных болезней птиц / В.В. Борисов [и др.] // Сборник материалов научной Сессии РАСХН. – М., 1998. – Ч. II. – С. 227-230.
12. Борисов, В.В. Влияние температурных условий хранения на антигенные свойства инактивированной вакцине против инфекционного бронхита кур и синдрома снижения яйценоскости-76 / В.В. Борисов [и др.] // Труды ВГНКИ. – 2004. – Т.64. – С. 138-144.
13. Борисов, А.В. Конструирование и иммунобиологические свойства экспериментальных вакцин против гриппа птиц: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук: 16.00.03 / А.В. Борисов. – Москва, 2009. – 24 с.
14. Борисова, И.А. Разработка технологии изготовления и контроля инактивированной вакцины против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции птиц: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 / И.А. Борисова. – Владимир, 2008. – 25 с.

15. Брылина, В.Е. Адъювантные технологии в вакцинологии / В.Е. Брылина, О.Б. Литвинов, Я.О. Дроздова // Вакцины нового поколения для профилактики особо опасных болезней сельскохозяйственных животных: сборник трудов Международной научно-практической конференции // Под. общ. ред. С.В. Позябина, Л.А. Гнездиловой. – М.: Сельскохозяйственные технологии, 2023. – С. 147-149.
16. Васильев, Ю.М. Вакцины против вируса гриппа птиц / Ю.М. Васильев // Вопросы вирусологии. – 2008. – Т. 53, № 6. – С. 4-15.
17. Соколов, В.Д. Ветеринарная фармация: учебник / В.Д. Соколов, Н.Л. Андреева, Г.А. Ноздрин, С.Н. Преображенский. – 2-е изд., испр. и доп. – СПб: Лань, 2022. – 512 с.
18. Волосникова, Е.А. Разработка вакцинного адъюванта на основе сквалена и изучение его адъювантных свойств / Е.А. Волосникова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2023. – Т. 25, № 3. – С. 685–690.
19. Власов, Н.А. Высокпатогенный грипп птиц. Текущая ситуация и меры контроля / Н.А. Власов [и др.] // Ветеринария. – 2010. – № 1. – С. 3-7.
20. Гаврилова, Н.Н. Микроскопические методы определения размеров частиц дисперсных материалов: учеб. пособие / Н.Н. Гаврилова, В.В. Назаров, О.В. Яровая. – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2012. – 52 с.
21. Горковенко, Н.Е. Биотехнология иммунобиологических препаратов для животных: учебное пособие для обучающихся факультета ветеринарной медицины по специальности 36.05.01 Ветеринария, специализация «Ветеринария» / Н.Е. Горковенко. – Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2022. – 118 с.
22. ГОСТ 11362 Нефтепродукты и смазочные материалы. Число нейтрализации. Метод потенциометрического титрования. – Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации. – 17 с.

23. ГОСТ 28085-2013 Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности. – М.: Стандартинформ, 2014. – 26 с.
24. ГОСТ 29188.3-91 Изделия косметические. Методы определения стабильности эмульсии. – М.: Издательство стандартов, 1992. – 4 с.
25. ГОСТ 31926-2013 Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности. – М.: Стандартинформ, 2014. – 17 с.
26. ГОСТ 33-2016 Нефть и нефтепродукты. Прозрачные и непрозрачные жидкости. Определение кинематической и динамической вязкости. – М.: Российский институт стандартизации, 2021. – 35 с.
27. ГОСТ 33821-2016 Средства лекарственные для ветеринарного применения Вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульгированная. Технические условия. – М.: Стандартинформ, 2016. – 8 с.
28. ГОСТ 3900-2022 Нефть и нефтепродукты. Методы определения плотности. – М.: Российский институт стандартизации, 2023. – 134 с.
29. ГОСТ 51069-97 Нефть и нефтепродукты. Метод определения плотности, относительной плотности и плотности в градусах API ареометром. – М.: Стандартинформ, 2008. – 8 с.
30. ГОСТ 5985-79 Нефтепродукты. Метод определения кислотности и кислотного числа. – М.: Стандартинформ, 2006. – 8 с.
31. Глебова, Н.Н. Государственная регламентация изготовления и контроля качества лекарственных средств: учебное пособие / Н.Н. Глебова. – Пенза: ПГУ, 2019. – 282 с.
32. Государственная фармакопея Российской Федерации. 15-е изд. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15> / (дата обращения 12.06.2025).
33. Государственный реестр лекарственных средств для ветеринарного применения [Электронный ресурс]. – Режим доступа:

<https://fsvps.gov.ru/files/gosudarstvennyj-reestr-lekarstvennyh-sredstv-dlja-veterinarnogo-primeneniya-perechen-lekarstvennyh-preparatov-proshedshih-gosudarstvennuju-registraciju/> (дата обращения 12.06.2025).

34. Грипп птиц и другие виды зоонозного гриппа. Информационные бюллетени [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(avian-and-other-zoonotic\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(avian-and-other-zoonotic)) (дата обращения 12.06.2025).

35. Гулюкин, М.И. Основные задачи борьбы с гриппом птиц / М.И. Гулюкин, Г.А. Грошева, З.В. Тихонова // Грипп птиц: профилактика и меры борьбы: Сб. матер, науч.-практ. конф. – М.: Юго-ВостокСервис. – 2007. – С. 80-82.

36. Гунар, О.В. Определение размеров жировых капель в эмульсиях для парентерального применения / О.В. Гунар, А.В. Доренская // Фармация. – 2022. – Т. 71, № 5. – С. 11-17.

37. Гусев, А.А. Вакцины эмульсионные на основе отечественного адьюванта «Эолан» / А.А. Гусев, С.В. Енгашев, В.А. Бабак // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов: материалы Международной практической конференции. – Армавир: Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, 2021. – С. 118-126.

38. Третьякова, Д.С. Липосомы как адьюванты и системы доставки вакцин / Д.С. Третьякова, Е.Л. Водовозова // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2022. – Т. 39, № 2. – С. 85-106.

39. Компанцев, Д.В. Вакцины – успехи и векторы развития / Д.В. Компанцев [и др.]. – Пятигорск: РИА-КМВ. – 2022. – С. 21.

40. Пат. 2510845 Российская Федерация МПК А61К 39/39 А61К 9/113. Адьювант / Э.Д. Джавадов, А.С. Дубовой, Е.В. Карпун, С.А. Малютин, Г.Н. Самусева; патентообладатели Э.Д. Джавадов, А.С. Дубовой, Е.В. Карпун, С.А. Малютин, Г.Н. Самусева. – № 2012139582/10 ; заявл. 14.09.2012 ; опубл. 10.04.2014, Бюл. № 10. – 11 с.

41. Джавадов, Э.Д. Иммунопрофилактика болезней птиц / Э.Д. Джавадов, Н.Д. Придыбайло, М.Е. Дмитриева. – СПб: ВНИВИП, 2020.
42. Доренская, А.В. Определение размеров жировых капель в эмульсиях для парентерального применения различными методами / А.В. Доренская // Актуальные вопросы науки. – 2016. – № 25. – С. 136-138.
43. Дубовой, А.С. Эффективность российского масляного адьюванта как компонента инактивированных вакцин против вирусных инфекций птиц / А.С. Дубовой, Г.Н. Самусева // Птицеводство. – 2023. – №12. – С. 75-78.
44. Евсеенко, В.А. Разработка и лабораторное получение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов, оценка их адьювантных свойств при иммунизации мышей гриппозными антигенами / В.А. Евсеенко [и др.] // БИО препараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2022. – Т. 22, № 2. – С. 170-186.
45. Зеленкова, Г.А. Эффективность различных способов вакцинации птицы в условиях промышленного птицеводства / Г.А. Зеленкова [и др.] // Ветеринарная патология. – 2023. – № 22 (3). – С. 17-24.
46. Иванов, А.В. Технологические подходы к созданию липосомальных форм вакцинных препаратов / А.В. Иванов // Биотехнология и биомедицинская инженерия: Сб. тр. III Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 75-летию Курского гос. мед. ун-та. – Курск, 2010. – С. 63-65.
47. Иванов, А. Анализ эмульсий в фармацевтической технологии / А. Иванов, Б. Петров // Российский медицинский журнал. – 2023. – № 34(4). – С. 12-18.
48. Акмырзаев, Н.Ж. Изучение безвредности и иммуногенной эффективности инактивированных моновалентных вакцин против болезни Ньюкасла в Республике Казахстан / Н.Ж. Акмырзаев [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т. 178, № 12. – С. 717-722.

49. Дубовой, А.С. Изучение эффективности масляного адъюванта отечественного производства для изготовления инактивированных вакцин против вирусных инфекций птиц / А.С. Дубовой, Г.Н. Самусева // Птицеводство. – 2023. – № 12. – С. 75-78.
50. Табынов, К.К. Иммуногенные свойства вакцины инактивированной эмульгированной против высокопатогенного гриппа птиц на домашних водоплавающих птицах / К.К. Табынов [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. – 2009. – № 3. – С. 44-48.
51. Ирза, В.Н. Эффективность вакцин против гриппа птиц с различными адъювантами / В.Н. Ирза, В.В. Дрыгин, А.А. Каргальцев // Ветеринария. – 2021. – № 3. – С. 22-27.
52. Исаенко, Е.Ю. Адъюванты в современной вакцинологии / Е.Ю. Исаенко [и др.] // Анналы Мечниковского института. – 2013. – № 4. – С. 5–21.
53. Рождественская, Т.Н. Испытание масляных адъювантов для изготовления вакцины против пастереллеза птиц / Т.Н. Рождественская [и др.] // Современные научные разработки и передовые технологии для промышленного птицеводства: сборник статей научно-практической конференции. – СПб: ООО «Медиапапир», 2023. – С. 109-117.
54. Панкратов, С.В. Испытание масляных адъювантов для изготовления вакцины против респираторного микоплазмоза птиц / С.В. Панкратов [и др.] // Вет. фармакол. вестник. – 2022. – №4. – С. 8–15.
55. Пиголева, И.В. Испытания эмульсионных вакцин на основе белых масел, полученных гидрокаталитической переработкой нефтяного сырья / И.В. Пиголева [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2017. – № 4. – С. 42-48.
56. Козлов, В.Г. Адъюванты в современной медицине и ветеринарии / В.Г. Козлов [и др.] // Микробиология, эпидемиология и иммунобиология. – 2014. – № 1. – С. 91–102.
57. Comberlato, A. Nucleic acids presenting polymer nanomaterials as vaccine adjuvants / A. Comberlato, K. Paloja, M.M.C. Bastings // J Mater Chem B. – 2019. № 7(41). – P. 6321-6346.

58. Компанцев, Д. В. Поиск перспективных адъювантных технологий в создании вакцинных препаратов / Д.В. Компанцев, В.А. Чахирова, А.А. Чахирова // Вестник последипломного образования в сфере здравоохранения. – 2023. – № 5. – С. 83-84.
59. Лозовой, Д.А. Контроль физических свойств инактивированных эмульсионных вакцин против вирусных болезней птиц / Д.А. Лозовой [и др.] // Сб. науч. тр. ВГНКИ. – М., 2005.– Т. 66.– С. 99-106.
60. Корреа, В.А. Вакцины, адъюванты и ключевые факторы иммунного ответа слизистой оболочки / В.А. Корреа, А.И. Портильо, Э. Де Гаспари // Иммунология. – 2022. – Т. 167, № 2. – С. 124-138.
61. Котанова, С.В. Новое поколение адъювантов, их роль в конструировании современных вакцин / С.В. Котанова, А.А. Шортанбаев, Б.Б. Бижигитова // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология. – 2010. – С. 149-152.
62. Koh, Y.T. Immunological consequences of using three different clinical/laboratory techniques of emulsifying peptide-based vaccines in incomplete Freund's adjuvant / Y.T. Koh [et al.] // J Transl Med. – 2006. – Vol. 4. – P. 42-53.
63. Красочко, П.А. Оценка морфологических изменений тканей животных при введении вакцин с масляными адъювантами / П.А. Красочко, И.А. Красочко, О.В. Высокоморная // Ученые Записки УО ВГАВМ. – 2012. – Т. 48, вып. 2, ч. I. – С. 88–94.
64. Лавренова, В.Г. Импорт вакцин в Россию. Перспективы развития / В.Г. Лавренова // Бизнес партнер. Сельское хозяйство России: ежегодный сборник. – 2016. – С. 30-33.
65. Сакаева, И.В. Значение показателей «Вязкость» и «Плотность» для контроля качества ряда стерильных лекарственных форм / И.В. Сакаева [и др.] // Ведомости НИЦЭСМП. – № 4. – С. 40-42.
66. Лин, А.А. Фармацевтический рынок: реализация стратегии импортозамещения / А.А. Лин, С.В. Соколова, М.В. Большакова // Проблемы современной экономики. – 2017. – № 2 (62). – С. 181-186.

67. Лисицын, А.Б. Химический состав мяса. Справочные таблицы общего химического, аминокислотного, жирнокислотного, витаминного, макро- и микроэлементного составов и пищевой (энергетической и биологической) ценности мяса. // А.Б. Лисицын [и др.]. – М.: ВНИИМП, 2011.–104 с.
68. Литвиненко, А.Н. Экономическая и национальная безопасность: проблема соотнесения понятий / А.Н. Литвиненко // Научно-технические ведомости СПбГПУ. – 2013. – Вып. 3 (173). – С. 9-16.
69. Лозовой, Д.А. Изучение дисперсных свойств вакцины с обратным типом эмульсии разными методами / Д.А. Лозовой [и др.] // Акт проблемы и перспективы развития агропром. комплекса. Пробл. агроэкономики, вет. мед. и биотехнол. в жив-ве. – Иваново, 2005.– Т. 2.– С. 121-128.
70. Маилян, Э.С. Импортзамещение в птицеводстве - миф или реальность? / Э.С. Маилян // БИО. – 2024. – № 6. – С. 12-33.
71. Мамков, Н.С. Оценка реактогенности компонентов эмульсионных вакцин на белых мышах / Н.С. Мамков, В.Ю. Савельев, А.И. Дудников // Актуальные пробл. вет. вирусологии: тез. докл. науч.конф. посвящ. 30-летию ВНИИИ. – Владимир, 1988. – Ч. 2. – С. 31-33.
72. Марченко, В.Ю. «Обзор эпизоотологической ситуации по высокопатогенному вирусу гриппа птиц в России в 2019 г.» // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 2. – С. 31–37
73. Марченко, В.Ю. Обзор эпизоотологической ситуации по высокопатогенному вирусу гриппа птиц в России в 2019 г. / В.Ю. Марченко [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 2. – С. 31-37
74. Медуницын, Н.В. Вакцинология // Н.В. Медуницын, А.В, Катлинский, Л.О. Ворслов. – М.: Практическая медицина, 2010. – 507 с.
75. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://mcsx.gov.ru> (дата обращения 12.06.2025).
76. Михалишин, В.В. Адьюванты и их использование / В.В. Михалишин, Н.С. Мамков // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных: матер.

Междунар. науч. конф. «Инфекционная патология животных», посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – 2008. – Т. 6. – С. 340–371.

77. Мухамедшина, А.Р. Меры и средства для профилактики гриппа птиц / А.Р. Мухамедшина // Ветеринария. – 2007. – № 6. – С. 18-19.

78. ГОСТР 59107-2020 Масла базовые. Технические условия. – М.: Стандартинформ, 2020. – 13 с.

79. Низамутдинова, А.Д. Исследование применения минеральных масел как углеводородного сырья в косметологии, медицине и промышленности / А.Д. Низамутдинова, С.М. Калашников // 73-я научно-техническая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых УГНТУ. – Уфа: Уфимский государственный нефтяной технический университет, 2022. – С. 151-152.

80. Никифорова, А.Н. Результаты изучения безопасности и иммуногенности отечественной субъединичной адъювантной вакцины Совигрипп у добровольцев 18–60 лет / А.Н. Никифорова, И.Н. Исакова-Сивак, М.К. Ерофеева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 2. – С. 72-78.

81. Обзор импорта ветеринарных вакцин в РФ в 2015 году (Abercade) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.abercade.ru/research/industrynews/15407.html> (дата обращения 12.06.2025).

82. Fox, C.B. An update on safety and immunogenicity of vaccines containing emulsion-based adjuvant / C.B. Fox, L. Haensler // Exp Rev Vac. – 2013. – Vol. 12(7). – P. 747–758.

83. ОФС.1.2.1.0014 «Плотность». Государственная Фармакопея Российской Федерации XV издания [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/plotnost/> (дата обращения 12.06.2025).

84. ОФС 1.2.4.0003.15 «Стерильность». Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания [Электронный ресурс]. – Режим

доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia-projects/izdanie-14/1/1-2/1-2-4/?vers=1442> (дата обращения 12.06.2025).

85. ОФС 1.2.3.0004 «Кислотное число». Государственная Фармакопея Российской Федерации XV издания [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-3-metody-kolichestvennogo-opredeleniya/kislotnoe-chislo/> (дата обращения 12.06.2025).

86. ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/1/1-1/statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-khimicheskogo-eksperimenta/> (дата обращения 12.06.2025).

87. ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами вып. 1». Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/1/1-1/statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-opredeleniya-spetsificheskoy-farmakologicheskoy-aktivnosti-lek/?ysclid=mbui6vp7qv180475463> (дата обращения 12.06.2025).

88. ОФС.1.2.1.0012 «Температура затвердевания» Государственная Фармакопея Российской Федерации XV издания [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/temperatura-zatverdevaniya> / (дата обращения 12.06.2025). ОФС.1.2.1.0015 «Вязкость» Государственная Фармакопея Российской Федерации XV издания [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/vyazkost/> (дата обращения 12.06.2025).

89. ОФС1.4.2.0028 «Размер частиц (капель) и их распределение по размерам в эмульсиях для парентерального применения» Государственная

Фармакопея Российской Федерации XV издания [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-4/1-4-2/razmer-chastits-kapel-i-ikh-raspredelenie-po-razmeram-v-emulsiyakh-dlya-parenteralnogo-primeneniya/> (дата обращения 12.06.2025).

90. Панкратов, С.В. Испытание масляных адъювантов для изготовления вакцины против респираторного микоплазмоза птиц / С.В. Панкратов [и др.] // Вет. фармакол. вестник. – 2022. – №4. – С. 8-15.

91. Панкратов, С.В. Использование MONTANIDE ISA 78 VG в качестве адъюванта при изготовлении противобактериальных вакцин для кур / С.В. Панкратов // Аграрная наука. – 2024. – № 8. – С. 51-55.

92. Пат. 2214275 Российская Федерация МПК А61К 39/23, С12N 7/00. Способ изготовления инактивированной эмульсионной вакцины против парвовирусной инфекции свиней / Т.З. Байбииков, Е.К. Долганова, К.Н. Груздев, В.В. Михалишин, Н.С. Дудникова, С.Г. Ерофеев, В.М. Гуленкин, И.Я. Курман; патентообладатель Федеральное государственное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных. – № 2002103821/13 ; заявл. 11.02.2002 ; опубл. 20.10.2003. – 12 с.

93. Пат. 2350350 Российская Федерация МПК А61К 39/145, С12N 7/00, А61P 31/16. Вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульгированная ФЛУ ПРОТЕКТ H5 и способ профилактики гриппа птиц / Д.К. Львов, Т.И. Алипер, П.Г. Дерябин, А.Д. Забережный, Т.В. Гребенникова, В.А. Сергеев, С.Н. Норкина; патентообладатели Д.К. Львов, Т.И. Алипер, П.Г. Дерябин, А.Д. Забережный, Т.В. Гребенникова, В.А. Сергеев, С.Н. Норкина. – № 2007123402/13 ; заявл. 22.06.2007 ; опубл. 27.03.2009, Бюл. № 9. – 9 с.

94. Пат. 2358760 Российская Федерация МПК А61К 39/135, С12N 7/00. Способ изготовления инактивированной эмульгированной вакцины против гриппа птиц и вакцина инактивированная эмульгированная против гриппа птиц / А.В. Борисов, Д.А. Лозовой, В.И. Смоленский, С.С. Охапкин, В.В. Дрыгин, Н.А. Яблочкина, В.В. Дорохин, И.Ю. Литенкова, П.П. Рахманин, С.В. Крюков, В.Н. Тренев, Б.В. Соловьев; патентообладатель

Открытое акционерное общество «Институт биотехнологий ветеринарной медицины». – № 2008109724/13 ; заявл. 17.03.2008 ; опубл. 20.06.2009, Бюл. № 17. – 12 с.

95. Пат. 2644256 Российская Федерация МПК А61К 39/02. Комбинированная вакцина PCV/ Mycoplasma hyopneumoniae/ PRRS (PCV/Mycoplasma hyopneumoniae/PRRS combination Vaccine) / Г.П. Нитцель, Д.Е. Гэлвин, Д.К. Гаррет, Д.Р.П. Кьюлович, Т.Л. Рикер, М.М. Сматцер; патентообладатель Зоэтикс Сервисиз ЛЛС. – № 2014140108; заявл. 03.04.2013; опубл. 08.02.2018, Бюл. № 4. – 85 с.

96. Пат. 2783468 Российская Федерация МПК G01N 15/02. Способ определения размера капель эмульсии / С.Ю. Андреев, А.И. Шайдуллин; патентообладатель Акционерное общество «Акционерная компания ОЗНА». – № 2021134874 ; заявл. 26.11.2021 ; опубл. 14.11.2022. – 8 с.

97. Пат. 2162339 Российская Федерация МПК А61К 39/102, А61L 2/16, С12N 1/00. Способ изготовления эмульсионной противопастереллезной вакцины / А.А. Гусев, В.С. Русалеев, А.И. Сосницкий, В.М. Гневашев, О.В. Прунтова; патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных. – № 2000109667 ; заявл. 17.04.2000 ; опубл. 27.01.2001. – 14 с.

98. Перспективы развития производства и применения иммунобиологических препаратов в XXI веке : Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 120-летию филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское Научно-производственное объединение «Биомед». – Пермь: ЗАО «Полиграфкомплект», 2018. – 336 с.

99. Пиголева, И.В. Испытания эмульсионных вакцин на основе белых масел, полученных гидрокаталитической переработкой нефтяного сырья / И.В. Пиголева [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2017. – № 4. – С. 42-48.

100. Приказ Минпромторга России от 20 июля 2021 г. № 2681 «План мероприятий по импортозамещению в фармацевтической промышленности Российской Федерации до 2024 года» [Электронный ресурс]. – Режим доступа:

<https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/401448546/> (дата обращения 12.06.2025).

101. Плотников, В.А. Импортзамещение: теоретические основы и перспективы реализации в России / В.А.Плотников, Ю.В.Вертакова // Экономика и управление. – 2014. – №11 (109). – С. 38-47.

102. Прунтова, О.В. Разработка технологии производства инактивированных эмульсионных вакцин против сальмонеллеза и пастереллеза свиней: автореф.дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.23 / О.В. Прунтова. – Покров, 2003. – 52 с.

103. Мороз, Н.В. Развитие поствакцинальной иммунной реакции у цыплят против высокопатогенного вируса гриппа птиц типа А подтипа H5N1 / Н.В. Мороз [и др.] // Эффективное животноводство. – 2023. – № 5(187). – С. 58-61.

104. Згировская, А.А. Разработка технологии изготовления вакцины против гриппа птиц подтипа H5N2 / А.А. Згировская [и др.] // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. – 2011. – Т. 47, № 2-1. – С. 34-38.

105. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации 2022 год [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://fsvps.gov.ru/files/jepizooticheskaja-situacija-v-rossijskoj-federacii-2022-god/?ysclid=mbuk8y1nsz331585486> (дата обращения 12.06.2025).

106. Пат. 2269361 Российской Федерации МПК А61К39/295 А61К39/23 А61К39/12 С12N7/00. Вакцина ассоциированная эмульсионная инактивированная против репродуктивно-респираторного синдрома и паравирусной инфекции свиней / Т.З. Байбииков, Е.К. Долганова, Н.С. Дудникова, К.Н. Груздев, С.А. Кукушкин, Е.П. Баборенко, В.Л. Гаврилова; патентообладатель Федеральное государственное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ ВНИИЗЖ). – № 2004108484/13 ; заявл. 25.03.2004 ; опубл. 10.02.2006, Бюл. № 4. – 22 с.

107. Рукосуева, Н.В. Препараты на основе наночастиц в клинической практике: достижения и перспективы / Н.В. Рукосуева [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2014. – Т. 6, № 4. – С. 18-35.
108. Русалеев, В.С. Разработка вакцины против пастереллеза птиц инактивированной эмульсионной / В.С. Русалеев [и др.] // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: Тр. Междунар. науч. - практич. конф. – Покров, 2003. – Ч.2. – С. 514-519.
109. Рынок вакцин, применяемых в ветеринарии в Российской Федерации [Текст]. – М.: Megaresearch, 2014. – 50 с.
110. Chen, W. Recent advances in the development of novel mucosal adjuvants and antigen delivery systems / W. Chen [etal.] // HumVaccin. – 2010. – Vol. 6 (9). – P. 706–714.
111. Садовников, Н.В. Лабораторная диагностика и вакцинопрофилактика гриппа птиц / Н.В. Садовников, И.М. Шараевская // Аграрный вестник Урала. – 2016. – № 11(153). – С. 56-61.
112. Самощенко, И.Ф. Стратегия развития фармотрасли России: итоги, цели, задачи / И.Ф. Самощенко, О.А. Фокина // Новые вызовы — новые исследования: сб. статей IV Международной научно-практической конференции. – Петрозаводск: Международный центр научного партнерства «Новая Наука» (ИП Ивановская И.И.), 2023. – С. 96-100.
113. Сафаргалиева, Э.М. Экспериментальное определение вязкости обратной эмульсии типа «вода в масле» от содержания воды на ротационном вискозиметре / Э.М. Сафаргалиева // Молодой ученый. – 2023. – № 46 (493). – С. 4-6.
114. Семакова, А.П. Адьювантные технологии в создании современных вакцин / А.П. Семакова, Н.И. Микшис // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 28-35.
115. Сидоров, К.О. Активные субстанции для отечественных производителей лекарств: прошлое, настоящее и будущее / К.О.Сидоров, А.А. Лин,

Н.В.Марченко // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 4. – С. 298-302.

116. Смирнов, В.В. Технология приготовления и контроля качества эмульсий / В.В. Смирнов, Д. Кузнецов // Журнал фармацевтических исследований. – 2022. – № 29 (2). – С.102-108.

117. Рождественская, Т.Н. Современные подходы к изготовлению инактивированных вакцин против пастереллеза птиц / Т.Н. Рождественская [и др.] // Аграрная наука. – 2022. – № 7-8. – С. 68-73.

118. Пугачев, О.Н. Современные проблемы гриппа птиц и меры его профилактики / О.Н. Пугачев [и др.] // Птицеводство. – 2017. – № 5. – С.57-60.

119. Пат. 2652889 Российская Федерация МПК А61К 39/135 С12N 7/00.Способ изготовления вакцины инактивированной эмульсионной против ящура и вакцина инактивированная эмульсионная против ящура / Д.А. Лозовой, В.А. Стариков, Д.В. Михалишин, А.В. Борисов, А.С. Шарыпов; патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). – № 2017119734 ; заявл. 06.06.2017 ; опубл. 03.05.2018. – 21 с.

120. Пат. 2184568 Российская Федерация МПК А61К 39/39 С12N 5/00.Способ определения токсичности и реактогенности масляных адьювантов и их компонентов / С.А. Самуйленко, А.Я. Самуйленко, В.И. Еремец, Е.А. Рубан, Б.В. Соловьев, А.Г. Бирюков, А.И. Албулов, М.В. Большакова, Т.И. Васенина, А.Я. Додосян; патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – №2000126125/13 ; заявл. 19.10.2000 ; опубл. 10.07.2002. – 8 с.

121. Степанова, В.В. Грипп птиц. Распространение и ликвидация болезни / В.В. Степанова, Т.И. Лоренгель // Современные тенденции развития ветеринарной науки и практики: сб. материалов Всероссийской (национальной) научно-практической конференции факультета ветеринарной

медицины ИВМиБ ФГБОУ ВО Омский ГАУ. – Омск: Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, 2023. – С. 171-174.

122. Чахирова, В.А. Технологический поиск адъювантной платформы для создания вакцин (обзор) / В.А. Чахирова [и др.] // International Journal of Medicine and Psychology. – 2022. – Т. 5, № 8. – С. 162-167.

123. Шабалина, Т.Н. Требования к белым минеральным маслам для ветеринарных эмульсионных вакцин / Т.Н. Шабалина [и др.] // Нефтегазопереработка – 2015: материалы Международной научно-практической конференции ГУП «Институт нефтехимпереработки РБ». – Уфа: Государственное унитарное предприятие «Институт нефтехимпереработки Республики Башкортостан», 2015. – С. 87-89.

124. ТУ 0253-031-54051488-2011 «Масло Вазелиновое МХ-150».[Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://prodrf.gostinfo.ru/turegistry> (дата обращения 12.06.2025).

125. ТУ 26.51.53-002-90758373-2017 «Лазерный анализатор Ласка-ТД» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://prodrf.gostinfo.ru/turegistry> (дата обращения 12.06.2025).

126. Шарыпов, А.С. Усовершенствование технологии изготовления эмульсионной противоящурной вакцины: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук: 06.02.02 / А.С. Шарыпов. – Владимир, 2019. – 23 с.

127. Федеральная служба государственной статистики (Росстат) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://ssl.rosstat.gov.ru/> (дата обращения 12.06.2025).

128. Флорес, М.А. Импортзамещение в производстве вакцин для национального календаря профилактических прививок – стратегия национальной безопасности / М.А. Флорес // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 2-1. – С. 66-72.

129. Чахиров, Л.С. Влияние минерального масла на вязкость и стабильность эмульсионной вакцины / Л.С. Чахиров, В.А. Чахирова, Д.В. Компанцев // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2024. – Т. 23, № 6S. – С. 108.
130. Чахиров, Л.С. Поиск и реализация высокотехнологичных адъювантных композиций для создания стабильных эмульсионных вакцинных препаратов / Л.С. Чахиров, Д.В. Компанцев, В.А. Чахирова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2024. – Т. 23, № 6S. – С. 145.
131. Чахиров, Л.С. Разработка состава и технологии получения адъювантных композиций, имеющих природу наночастиц / Л.С. Чахиров, Д.В. Компанцев, В.А. Чахирова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2024. – Т. 23, № 6S. – С. 153.
132. Чахирова, В.А. Изучение стабильности основных показателей качества эмульсионной вакцины против вируса гриппа H5N1 / В.А. Чахирова, Д.В. Компанцев, А.А. Чахирова // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2024. – Т. 26, № 11. – С. 64-69.
133. Машкин, Е.С. Стабилизация и разрушение эмульсий / Е.С. Машкин, К.И. Хоружий., Е.М. Шатохина // Материалы МСНК «Студенческий научный форум 2024». – 2024. – №9. – С. 126-129.
134. Яновский, В.А. Синтез и исследование свойств эмульгаторов обратных эмульсий на основе производных кислот дистиллята таллового масла и этаноламинов / В.А. Яновский [и др.] // Вестник Томского государственного университета. – 2013. – № 370. – С. 194-199.
135. Aucouturier, J. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines / J. Aucouturier, L. Dupuis, V. Ganne // Vaccine. – 2001. – Vol. 19 (17-19). – P. 2666-2672.
136. Awate, S. Mechanisms of action of adjuvants / S. Awate, L.A. Babiuk, G. Mutwiri // Frontiers in Immunology. – 2013. – Vol. 4. – 10 p.
137. Coffman, R.L. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work / R.L. Coffman, A. Sher, R.A. Seder // Immunity. – 2010. – Vol. 33 (4). – P. 492-503.

138. Dubé, J.Y. Synthetic mycobacterial molecular patterns partially complete Freund's adjuvant / J.Y. Dubé [et al.] // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 5874-5883.
139. Herath, C. Experimental iron-inactivated *Pasteurella multocida* A: 1 vaccine adjuvanted with bacterial DNA is safe and protects chickens from fowl cholera / C. Herath [et al.] // *Vaccine.* – 2010. – Vol. 28 (11). – P. 2284-2289.
140. Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a Joint WHO\FAO\UNU Exper Consultation. – Geneva: WHO, 2007. – 284 p.
141. Francis, M.J. Recent Advances in Vaccine Technologies / M.J. Francis // *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* – 2018. – Vol. 48(2). – P. 231-241.
142. Ghadimipour, R. Effects of selected adjuvants on immunogenicity and protectivity of *Pasteurella multocida* bacterin vaccine in chickens / R. Ghadimipour [et al.] // *Arch. Razi Inst.* – 2021. – V. 76, № 4. – P. 741-749.
143. Haradi, A.M. Vaccines adjuvants: scientific challenges and strategic initiatives / A.M. Haradi, G. Davies, O.F. Olesen // *Expert Rev. Vaccines.* – 2009. – Vol. 8(3). – P. 293-298.
144. HogenEsch, H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants / H. HogenEsch // *Vaccine.* – 2002. – Vol. 31(S). – P. S34-S39.
145. ФАО назвала ситуацию с гриппом птиц «беспрецедентной» и призвала задуматься о вакцинации. Ветеринария и жизнь. Информационный портал и газета [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://vetandlife.ru/epizootic-situation/fao-nazvala-situaciju-s-grippom-ptic-besprecedentnoj-i-prizvala-zadumatsya-o-vakcinacii/?ysclid=mbunkvqsao354270809> (дата обращения 12.06.2025).
146. Вакцинация против высокопатогенного гриппа птиц. Журнал «Ценовик. Сельскохозяйственное обозрение» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.tsenovik.ru/articles/veterinariya/vaktsinatsiya-protiv-vysokopatogennogo-grippa-ptits/> (дата обращения 12.06.2025).

147. Lindblad, E.B. Aluminium compounds for use in vaccines / E.B. Lindblad // Immunology and Cell Biology. – 2004. – Vol. 82(5). – P. 497-505.
148. McCluskie M.J. Novel adjuvant systems / M.J. McCluskie, R.D. Weeratna // Curr. Drug Targets Infect. Disord. – 2001. – Vol. 1(3). – P. 263-271.
149. McKee, A.S. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants / A.S. McKee, M.W. Munks, P. Marrack // Immunity. – 2007. – Vol. 27(5). – P. 687-690.
150. Petrovsky, N. Vaccine adjuvants: current state and future trends / N. Petrovsky, J. Aguilar // Immunol. Cell Biol. – 2004. – Vol. 82(5). – P. 488-496.
151. Reed, S.G. Key roles of adjuvants in modern vaccines / S.G. Reed, M.T. Orr, C.B. Fox // Nature Medicine. – 2013. – Vol. 19(12). – P. 1597-1608.
152. Robinson, J.M. Chapter 5. Vaccine production: main steps and considerations. In: Bloom B.R., Lambert P.H., editors. The Vaccine Book. Second edition / J.M. Robinson. - San Diego: Academic Press, 2016. – P. 77-96. - 664 p.
153. Schmidt, C.S. Smart adjuvants / C.S. Schmidt, W.J. Morrow, N.A. Shekh // Expert Rev. Vaccines. – 2007. – Vol. 6(3). – P. 391-400.
154. Hinkelmann, K. Design and Analysis of Experiments. / K. Hinkelmann & O. Kempthorne // Wiley. – 2008. – Vol. I and II (Seconded.). SBN 978-0-470-38551-7.
155. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6813708/#:~:text=The%20Student's%20t%20test%20is,mean%20difference%20was%20statistically%20significant.>
156. Gurvich, V. Naumova, M. Логические противоречия в тестах множественных сравнений ANOVA и Tukey-Kramer с более чем двумя группами наблюдений / V. Gurvich, M. Naumova // Symmetry. – 2021. – №13. P - 1387.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АПК – Антиген-презентирующие клетки
- В/М – Эмульсия вода в масле
- ВНИВИП – Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства
- ГЛБ – Гидрофильно-липофильный баланс
- ГФ – Государственная фармакопея
- М/В – Эмульсия масло в воде
- НА – Гемагглютинин
- НАФ – Неполный адъювант Фрейнда
- НИИ – Научно-исследовательский институт
- НД – нормативный документ
- НТД – Нормативно-технический документ
- ОФС – Общая фармакопейная статья
- ПАВ – Поверхностно-активное вещество
- ПАФ – Полный адъювант Фрейнда
- ПЭГ – Полиэтилен гликоль
- ПЭО – Полиэтилен оксид
- РТГА – Реакции торможения гемагглютинации
- РФ – Российская Федерация
- СВО – Специальная военная операция
- ТУ – Технические условия
- ТЭА – Триэтанолламин
- ФС – Фармакопейная статья

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

УТВЕРЖДАЮ:

Директор
ФКП «Ставропольская биофабрика»
А.Г. Пильтэй
« 09 » 01 20 24 г



АКТ О ВНЕДРЕНИИ

Предмет внедрения: Поиск и реализация перспективных адьювантных технологий в процессе создания вакцин.

Кем предложена: Чахировой В.А., соискателем кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии ПМФИ - филиала ВолгГМУ МЗ РФ. **Где и кем внедрено:** ФКП «Ставропольская биофабрика», г.Ставрополь, ул. Биологическая 18.

Цель внедрения: Расширение ассортимента адьювантных композиций и структуры выпускаемой продукции ФКП «Ставропольская биофабрика», современными вакцинными препаратами, выявление возможности введения в эксплуатацию технологической линии по производству масляных адьювантов.

Ответственный за внедрение: главный технолог ФКП «Ставропольская биофабрика» Коваленко Д.В.

Результаты внедрения: Предложенная ПМФИ - филиалом ВолгГМУ технология получения масляных адьювантов и вакцины против вируса гриппа птиц H5N1 успешно апробирована в декабре 2023г. на производственном участке ФКП «Ставропольская биофабрика». Технология получения вакцины, на основе разработанного масляного адьюванта, может реализовываться в производственном цехе ФКП «Ставропольская биофабрика».

Эффективность внедрения: Эффективное использование разработанной масляной композиции в составе вакцинных препаратов позволит использовать её в качестве масляного адьюванта и замены субстанции импортного производства.

Главный технолог
ФКП «Ставропольская биофабрика»
Коваленко Д.В.

Согласовано
**СТАВРОПОЛЬСКАЯ
БИОФАБРИКА**
Заместитель директора
по развитию Вуль В.Ф.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

УТВЕРЖДАЮ:

Директор
ФКП «Ставропольская биофабрика»
А.Г. Пильтэй
«23» 01 / 2024 г

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

Предмет внедрения: Разработка лабораторной технологии получения вакцины при использовании готовых масляных адьювантов: MuktaVas 70 Me Vas (Индия), CoralVas Coral (Турция).

Кем предложена: Чахировой В.А., соискателем кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии ПМФИ - филиала ВолгГМУ МЗ РФ.

Где и кем внедрено: ФКП «Ставропольская биофабрика», г. Ставрополь, ул. Биологическая 18.

Цель внедрения: Расширение ассортимента адьювантных композиций и структуры выпускаемой продукции ФКП «Ставропольская биофабрика», современными вакцинными препаратами, выявление возможности введенной в эксплуатацию технологической линии по производству масляных адьювантов.

Ответственный за внедрение: главный технолог ФКП «Ставропольская биофабрика» Коваленко Д.В.

Результаты внедрения: Предложенная ПМФИ - филиалом ВолгГМУ технология получения вакцины против вируса гриппа птиц H5N1 на основе масляных адьювантов успешно апробирована в декабре 2023г. на производственном участке ФКП «Ставропольская биофабрика». Технология получения вакцины может реализовываться в производственном цехе ФКП «Ставропольская биофабрика».

Эффективность внедрения: Эффективное использование разработанной технологии получения масляных вакцин, на основе адьювантов MuktaVas 70 Me Vas и CoralVas Coral, адаптированной к условиям производства в РФ, позволяет заменить дорогостоящую субстанцию Montanide Seppic.

Главный технолог
ФКП «Ставропольская биофабрика»
Коваленко Д.В.

Согласовано
СТАВРОПОЛЬСКАЯ
БИОФАБРИКА
Заместитель директора
по развитию Вуль В.Ф.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3



ПЯТИГОРСКИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

- ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАЩЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11
ОКПО 01962942 ИНН/КПП 3444048472/263248001 тел. (8793) 32-44-74, 32-92-66, факс 32-92-67

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по учебной и
воспитательной работе
Пятигорского медико-фармацевтического
института

Филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ
Минздрава России
д.ф.и. профессор

И.П. Кодониди
" 30 " _____ 2025г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

Результатов научно-исследовательской работы
в учебный процесс

1. **Наименование предложения для внедрения:** «Состав и технологии масляных адьювантов для инактивированных вакцин», разработан при выполнении диссертационной работы «Поиск и реализация перспективных адьювантных технологий в процессе создания вакцин»

2. **Автор разработки:** Чахирова В.А., соискатель кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии, Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

3. **Куда и где внедрено:** использовано в образовательной деятельности кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии

ПМФИ – филиала ФГБОУ «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

4. Результаты внедрения: результаты исследований включены в разделы дисциплин «Биотехнология» «Иммунобиотехнология. Производство вакцин», «Изготовление эмульсий». Предложенные составы и технология соответствуют современным тенденциям развития фармацевтической технологии и биотехнологии, их применение в учебном процессе позволило значительно улучшить качество подготовки специалистов по специальности 33.05.01 «Фармация».

Декан фармацевтического факультета,
заведующий кафедрой «Биологии и
физиологии» Пензенского медико-
фармацевтического института – филиала
ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России,
доктор фармацевтических, доцент



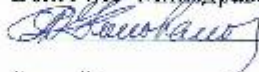
И.Н. Дьякова

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

ПЯТИГОРСКИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ –
филиал федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

УТВЕРЖДАЮ:

Заместитель директора по
НИР НИМФИ – филиала ФГБОУ ВО
ВолГМУ Минздрава России

 Д.А. Коновалов

« _____ » _____ 2025 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство вакцины против высокопатогенного вируса птичьего
гриппа типа А подтипа H5N1 инактивированная эмульсионная