

Процедура обновления штамма вакцины против гриппа в странах ЕС. Вопросы качества

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

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 15.09.2016. Принята к публикации 07.02.2017.

Несмотря на регулярно проводимые профилактические мероприятия, в 2009–2010 годах произошло развитие пандемии гриппа. Анализ опыта пандемии выявил недостатки регуляторных требований, касающихся как разработки новых вакцин против гриппа, так и процедуры замены/обновления сезонных штаммов вакцин против гриппа. Учитывая опыт пандемии гриппа, Европейским медицинским агентством по лекарственным средствам (ЕМА) в 2014–2016 годах были обновлены уже имеющиеся и разработаны новые рекомендации по оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований при разработке вакцин против гриппа. Обновленные требования касаются не только вопросов оценки качества, но и процедуры замены/обновления актуальных штаммов сезонных, препандемических и пандемических вакцин против гриппа. Опыт, накопленный ЕМА, может быть полезен при подготовке отечественной нормативной базы, необходимой для повышения эффективности и безопасности вакцин против гриппа.

Ключевые слова: вакцины против гриппа (сезонные, пандемические, препандемические); аттенуированные вакцины (аттенуированные вакцинные штаммы); замена сезонного штамма.

Библиографическое описание: Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Бондарев ВП. Процедура обновления штамма вакцины против гриппа в странах ЕС. Вопросы качества. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(1): 3–12.

Грипп входит в группу респираторных вирусных инфекций и является острым инфекционным заболеванием, вызываемым вирусом гриппа. Название заболевания происходит от французского «grippe» или немецкого «grippen», что можно перевести как «схватить» или «резко жать». Во многих европейских языках грипп называют «инфлюэнцей» (от итальянского слова «influenza» — «воздействие») в связи с очень быстрым заражением указанным заболеванием большого количества населения.

Вирусы гриппа относятся к семейству вирусов Orthomyxoviridae, которое включает роды Influenza A, B, C (A, B, C — типы). В зависимости от специфичности поверхностных антигенов (гликопротеинов) — гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА), вирусы делятся на подтипы (серотипы). В настоящее время известны 16 типов гемагглютинина (обозначаемые как H1, H2, ..., H16) и 9 типов нейраминидазы (N1, N2, ..., N9). Комбинация типов гемагглютинина и нейраминидазы (например, H1N1, H3N2, H5N1 и т.п.) называется подтипом; из 144 теоретически возможных подтипов известны 115. Развитие эпидемии чаще всего вызывают три подтипа НА (H1, H2, H3) и два подтипа НА (N1, N2) [1].

Циркуляция вируса в естественных условиях сопровождается очень частым изменением его антигенной структуры. В зависимости от места, где впервые был выявлен вирус, и его антигенной структуры название вируса включает номер, место и год выделения вируса (например, A/New Caledonia/120/99 (H1N1) или B/Hong Kong/330/2001). Согласно Международной номенклатуре, обозначение штаммов вируса включает следующие сведения: род, место изоляции, номер изолята, год изоляции, разновидность гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА). Например, A/Singapore/1/57 (H2N2) обозначает вирус

рода А, выделенный в 1957 г. в Сингапуре, 1 — номер изолята, имеющий разновидность антигенов H2N2.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) только тяжелыми формами гриппа в мире ежегодно заболевает 3–5 млн человек. В России ежегодно заболевает гриппом и другими ОРВИ 25–35 млн, из них 45–60 % — дети. По оценкам ВОЗ от всех вариантов вируса во время сезонных эпидемий в мире ежегодно умирает от 250 до 500 тыс. человек (большинство из них старше 65 лет), в некоторые годы число смертей может достигать миллиона. Экономический ущерб Российской Федерации от сезонного эпидемического гриппа составляет до 100 млрд руб/год (около 85 % экономических потерь, связанных с инфекционными заболеваниями) [2].

Наиболее эффективным средством борьбы с гриппом является вакцинация. Основная проблема производства вакцин против гриппа связана с необходимостью ежегодного сезонного обновления штамма вируса гриппа, поэтому очень важно выбрать именно тот штамм, который будет актуальным для профилактики в данном сезоне. В связи с этим в 1947 году ВОЗ была запущена Глобальная программа по мониторингу гриппа. На основе учета заболеваемости и контроля за изменением штаммов вируса ВОЗ два раза в год публикует рекомендации о штаммах вирусов, которые могут быть потенциальной причиной развития сезонной эпидемии гриппа. На основе этих рекомендаций национальные комитеты контроля гриппа с учетом региональной ситуации составляют рекомендации для производителей о предполагаемых штаммах для сезонных вакцин.

Для стран северного полушария ВОЗ публикует рекомендации о сезонных штаммах обычно в феврале. Поэтому, чтобы получить эффект от вакцинации против гриппа, с февраля в очень короткие сроки необходимо разработать,

изучить, оценить и зарегистрировать вакцину для конкретного эпидемического сезона. Как показал опыт развития эпидемий, еще более сложная ситуация с разработкой вакцин наблюдается при развитии пандемий гриппа.

Поэтому во многих странах приняты особые нормативные требования, регламентирующие разработку и регистрацию сезонных и пандемических вакцин против гриппа, прежде всего это касается сроков и объема представляемых для регистрации данных. В странах Европейского Союза (ЕС) накоплен большой опыт регистрации препаратов для профилактики инфекционных заболеваний и вакцинации населения.

В обзоре представлен анализ нормативных документов, регламентирующих оценку качества при замене штаммов вакцин против гриппа в странах Европейского Союза.

Пандемия гриппа 2009–2010 годов

Периодичность возникновения пандемий гриппа в человеческой популяции связана с шифтовыми (кардинальными) изменениями антигенных характеристик возбудителя. Обычно антигенный шифт вирусов гриппа А возникает при смене одного типа гемагглютинаина (или нейраминидазы) на другой, т.е. с появлением нового антигенного варианта вируса. Последняя пандемия произошла в 2009–2010 годах. Ожидание пандемии и подготовка к ней начались еще в 1997 году после вспышки гриппа у людей, вызванного высокопатогенным вирусом гриппа А(H5N1), в Гонконге [3]. При этом считалось, что именно этот штамм может стать причиной пандемии в ближайшее время. В 2009 году ВОЗ опубликовала сообщение о начале пандемии гриппа, вызванной появлением совершенно нового возбудителя гриппа А(H1N1) (A/California/7/2009), выделенного от заболевших людей в Мексике.

Вирус А(H1N1) (A/California/7/2009) некоторое время циркулировал в популяции свиней в Мексике и на юге США, не вызывая заболеваний ни у животных, ни у человека. В марте 2009 года авирулентный вирус, по непонятным причинам, мутировал в вирулентный и началась эпизоотия гриппа свиней в Мексике. Затем вирус свиного гриппа А(H1N1) (A/California/7/2009) стал патогенным для человека. До сих пор отсутствует единое мнение о причинах, которые привели к появлению патогенного для человека вируса. Начавшаяся в Мексике эпидемия заболевания среди людей уже через 3 месяца охватила 137 стран [4].

Ситуация при пандемии 2009–2010 годов осложнялась тем, что не было зарегистрированной вакцины против данного штамма гриппа, поэтому в начале пандемии большие надежды возлагали на противовирусные препараты (например, осельтамивир) [5].

Учитывая уроки пандемии 2009–2010 гг., ЕМА были обновлены основные нормативные требования, регламентирующие оценку качества, проведение доклинических и клинических исследований и процедуру регистрации вакцин против гриппа. При этом каждый новый разработанный документ заменял несколько документов, которые регламентировали отдельные стороны разработки и регистрации вакцин против гриппа до пандемии 2009–2010 годов (табл. 1).

Оценка качества вакцин против гриппа

Новые требования для оценки качества вакцин против гриппа включают разделы, посвященные оценке качества

инактивированных, аттенуированных вакцин, и содержат ряд приложений, касающихся практических вопросов изучения качества вакцин.

Инактивированные вакцины

Инактивированные вакцины против сезонного гриппа. Инактивированные вакцины против сезонного гриппа получают на куриных эмбрионах или на клеточных субстратах. Разрабатываемые вакцины должны соответствовать требованиям соответствующих фармакопейных статей Европейской фармакопеи (ЕФ) [9–15].

Штамм-кандидат в вакцины (СВВ) может быть представлен производителем Межлабораторным центром ВОЗ (СВ), специализированной лабораторией (ЕРЛ) или другой сертифицированной лабораторией, специализирующейся на получении посевных штаммов вируса гриппа. При этом возможны следующие варианты СВВ:

- высокопродуктивный классический реассортант;
- реассортант, полученный методом обратной генетики;
- дикий штамм вируса (нереассортантный).

Оценка качества СВВ проводится на основании требований ЕФ. Для регистрации вакцины в первую очередь необходимо представить общую характеристику разработки вакцинного штамма (история посевного штамма, уровень пассажей). Для штаммов, которые получены с использованием методов обратной генетики или с использованием клеток животных — материалы, которые свидетельствуют об отсутствии контаминации вакцинного штамма посторонними вирусами. Если в качестве штамма для вакцины разработчиком выбран свой собственный дикий штамм, то необходимо представить антигенную характеристику данного штамма.

Получение посевных серий штамма проводится в контролируемой среде в условиях, соответствующих требованиям GMP. В каждой серии посевного материала определяют антигены HA и NA, для чего обычно используют специфические антисыворотки, получаемые из межлабораторного центра ВОЗ. Кроме того, проводится контроль посевного материала на наличие посторонних примесей (например, компонентов культуральной среды), которые могут представлять угрозу безопасности вакцины.

Представляемые для регистрации материалы должны, прежде всего, продемонстрировать безопасность вакцины, поэтому они должны содержать:

- информацию о вирусах, которые потенциально могут присутствовать в вакцинах (к патогенным вирусам относятся: респираторно-синцитиальный вирус, аденовирус, вирус парагриппа, риновирусы, коронавирусы, энтеровирус, EBV, HSV, CMV и микоплазмы);
- сведения о субстрате, используемом для выделения штамма;
- данные о рисках вирусной безопасности, связанных с использованием сырья, реагентов и субстратов животного происхождения;
- историю получения посевного штамма вируса со всеми результатами тестирования на наличие внешних посторонних агентов.

В досье должно быть подробно представлено описание производственного процесса получения вакцины. При выявлении посторонних включений (агрегатов) необходимо установить причину их появления. Валидация этапов производственного процесса должна продемонстрировать, что критические стадии процесса находятся в пределах установленных параметров. К критической стадии производственного процесса относится инаktivация вак-

цинного вируса. При этом необходимо продемонстрировать, что инаktivация не влияет на антигенные свойства вакцины. Важным является процесс расщепления вириона, для контроля которого могут быть использованы такие методы, как SDS-PAAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с SDS) и изопикническое ультрацентрифугирование в градиенте плотности. Контроль этапа расщепления должен быть продемонстрирован как минимум на трех последовательных сериях.

Для вакцин, которые получены с использованием куриных эмбрионов, необходимо продемонстрировать, что вирус птичьего лейкоза и микоплазмы инаktivированы. Кроме того, процесс инаktivации вирусов должен обеспечить инаktivацию и других патогенных для птиц агентов (например, аденовируса птиц).

Выбор показателей, которые необходимо включить в спецификацию, в первую очередь зависит от выбранного штамма, а также вида вакцины (например, вакцины, полу-

ченные на основе цельного вириона, расщепленного вириона или вирусных субъединиц). Использование дополнительных методов оценки для расширенной характеристики штамма может быть необходимо при регистрации вакцины в случае замены сезонного штамма.

Характеристика биохимических, иммунологических и физико-химических свойств антигена HA должна быть проведена с помощью широкого спектра современных аналитических методов. В соответствии с требованиями ЕФ наличие и тип антигена HA необходимо подтвердить с помощью соответствующих ферментативных или иммунологических методов в моновалентных продуктах. При этом необходимо охарактеризовать и количественно определить антигены (кроме HA), которые могут способствовать иммуногенности вакцины.

В тех случаях, когда в субстанции и (или) в готовой форме вакцины определяются агрегаты, они должны быть охарактеризованы (например, по размерности, составу,

Таблица 1. Документы, регламентирующие оценку качества, проведение доклинических и клинических исследований вакцин против гриппа, разработанные на основе результатов анализа пандемии гриппа 2009–2010 гг.

Этап разработки вакцины	Нормативные документы, используемые до пандемии 2009–2010 гг.	Нормативные документы, которые были разработаны после пандемии 2009–2010 гг.
Оценка качества	• Note for guidance on harmonization of requirements for influenza vaccines (CPMP/BWP/214/96) • Cell culture inactivated influenza vaccines — Annex to note for guidance on harmonization of requirements for influenza vaccines (CPMP/BWP/214/96) • Points to consider on the Development of Live Attenuated Influenza Vaccines (EMA/CPMP/BWP/2289/01) • Procedural advice on the submission of variations for annual update of human influenza inactivated vaccines applications in the centralized procedure (EMA/CHMP/BWP/99698/2007 Rev. 1) • Annex I variation application(s) content for live attenuated influenza vaccines (EMA/CHMP/BWP/577998/2010) • Guideline on Dossier Structure and Content for Pandemic Influenza Vaccine Marketing Authorization Application (EMA/CPMP/VEG/4717/03 rev. 1) • Guideline on Submission of Marketing Authorization Applications for Pandemic Influenza Vaccines through the Centralized Procedure (EMA/CPMP/4986/03) • Guideline on Influenza vaccines prepared from viruses with the potential to cause a pandemic and intended for use outside of the core dossier context (CHMP/VWP/263499/06) • Guideline on quality aspects on the isolation of candidate influenza vaccine viruses in cell culture (EMA/CHMP/BWP/368186/2011)	Guideline on influenza vaccines — quality module (25 April 2014. EMA/CHMP/BWP/310834/2012) [6]
Доклинические и клинические исследования	• Guideline on Dossier Structure and Content for Pandemic Influenza Vaccine Marketing 9 Authorization Application (EMA/CPMP/VEG/4717/03 rev. 1) 10 • Guideline on influenza vaccines prepared from viruses with the potential to cause a pandemic and 11 intended to be used outside of the core dossier context (CHMP/VWP/263499/2006) 12 • Explanatory note on the withdrawal of the note for guidance on harmonization of requirements for 13 influenza Vaccines (CPMP/BWP/214/96) and of the core SmPC/PL for inactivated seasonal influenza 14 vaccines (CMDh/128/2003/Rev5 and CMDh/129/2008/Rev3) 15 • Points to Consider on the development of live attenuated influenza vaccines 16 (EMA/CPMP/BWP/2289/01) 17 • Core SmPC for pandemic vaccines (EMA/CHMP/VEG/193031/2004)	Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module (21 July 2016. EMA/CHMP/VWP/457259/2014) [7]
Процедура обновления/замены сезонного штамма вакцин против гриппа	• Procedural advice on the submission of variations for annual update of human influenza inactivated vaccines applications in the centralized procedure (EMA/CHMP/BWP/99698/2007 Rev. 2) • Guideline on submission of marketing authorization applications for pandemic influenza vaccines through the centralized procedure (EMA/CPMP/4986/03)	Guideline on influenza vaccines — submission and procedural requirements. Regulatory and procedural requirements module (May 2015. EMA/56793/2014) [8]

количеству и профилю растворения). Особое внимание необходимо обратить на потенциальное влияние агрегатов на иммуногенность вакцины.

При характеристике вакцины необходимо идентифицировать и количественно оценить примеси, связанные с производственным процессом (например, овальбумин, остаточное содержание белков клеток куриного эмбриона, остаточная ДНК клетки-продуцента, реагенты, используемые для инактивации/расщепления, очистки).

Общепризнанным показателем специфической активности вакцины против гриппа является определение гемагглютинаина методом одиночной радиальной иммунодиффузии (SRD), для сезонной инактивированной вакцины рекомендуемая доза составляет 15 мкг SRD-антигена. В некоторых случаях может возникнуть необходимость использования альтернативных методов определения активности (ИФА, ВЗЖХ). При этом необходимо представить обоснование использования альтернативных методов.

Если в состав вакцины входит адъювант, то в досье на вакцину должна быть представлена подробная информация об адъювантах, включающая сведения об исходных материалах, производственном процессе, химических и физических свойствах, методах контроля, данных по оценке стабильности и взаимодействию антигена и адъюванта. Подробно должен быть описан производственный процесс, и особое внимание должно быть обращено на представление процесса и условий конъюгации адъюванта с антигеном. При этом необходимо подтвердить стабильность вакцины с адъювантом в процессе хранения.

Оценка стабильности проводится согласно ЕФ. Изучение стабильности субстанции и готовой формы вакцины проводится в режиме реального времени и в стрессовых условиях хранения.

Препандемические (зоонозные) вакцины. Необходимо обосновать выбор штамма для препандемической вакцины, в первую очередь используя рекомендации ВОЗ, касающиеся антигенной и генетической характеристики штаммов A(H5N1), A(H7N3), A(H9N2) и штаммов, используемых для производства сезонных вакцин для человека.

В качестве штамма-кандидата могут быть использованы высокопатогенные подтипы вируса H5 или H7, поэтому необходимо продемонстрировать снижение их патогенности в исследованиях *in vitro* и *in vivo* на этапе доклинических исследований. Низкопатогенные вакцины оценивают в соответствии с рекомендациями ВОЗ и рекомендациями для оценки сезонных вакцин [16]. В качестве кандидатов могут быть использованы штаммы птичьего, свиного, человеческого и нерассортантные штаммы дикого типа вируса гриппа.

Наиболее частыми кандидатами в препандемические вакцины являются:

- полученный из высокопатогенного штамма методом обратной генетики реассортантный H5N1 (на своем сайте ВОЗ публикует список доступных CVV H5N1). В связи с продолжающимся распространением вируса H5 человека можно предполагать развитие пандемии, вызванной подтипами H5 или H7 вируса гриппа;
- полученный из высокопатогенного вируса птичьего гриппа методом обратной генетики реассортантный H7N1; в последние годы вспышки гриппа у европейских птиц были связаны с подтипами H7N1 и H7N7 вируса гриппа, которые ассоциируются с развитием инфекции у человека;
- вирус H5N3 птичьего гриппа. Вакцины, полученные из штамма H5N3 A/Duck/Singapore/97, уже были изучены в клинических условиях; антигенность этого штамма очень

близка к высокопатогенному штамму H5N1 A/Hong Kong/156/97;

– вирус H9N2. Штаммы H9N2 вируса гриппа человека, такие как A/Hong Kong/1073/99, уже используются для экспериментального производства вакцин, которые были протестированы в клинических условиях. Инфекции, вызванные вирусом H9N2, эпизодически развиваются среди людей;

– вирус H2N2. Штамм вируса гриппа человека, вызвавший пандемию 1957 года, A/Singapore/1/57 недавно был использован для экспериментальной разработки и производства вакцин [6].

При использовании метода обратной генетики для получения штамма необходимо учитывать дополнительные требования, касающиеся безопасности вакцин. Так, клеточный субстрат для получения CVV должен отвечать дополнительным требованиям, изложенным в ЕФ; при производстве вакцины необходимо использовать банк одобренных клеток. Следует учитывать, что материалы, используемые для получения CVV методом обратной генетики, являются факторами потенциальных рисков вирусной, бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации.

При разработке вакцины необходимо продемонстрировать снижение патогенности вирусов подтипов H5 и H7 в результате их генетической модификации или удаления аминокислотных последовательностей, ответственных за проявления вирулентности при расщеплении в области HA. Это необходимо подтвердить на уровне контроля пассажей штаммов и на трех сериях готового вакцинного препарата.

Производственный процесс препандемической вакцины может быть основан на процессе, который применяется для лицензированной вакцины (например, сезонной вакцины) или другого производства вакцин. Тем не менее, производственный процесс должен быть подробно описан в досье. Процесс может быть адаптирован к новому производству и новые стороны процесса также должны быть подробно описаны и обоснованы.

Вакцины могут выпускаться в виде одной дозы или нескольких доз. Препарат в виде нескольких доз требует использования консерванта, в связи с этим необходимо изучить возможное влияние консерванта на основные свойства вакцины. Если в качестве консерванта используется тиомерсал, необходимо предусмотреть оценку его количественного содержания в готовом препарате.

При стандартизации вакцины необходимо обратить особое внимание на содержание HA, его уровень в препандемических вакцинах, как правило, должен быть значительно ниже по сравнению с сезонными вакцинами.

Стабильность препандемических вакцин оценивается согласно ЕФ и руководству ICH Q5C [17]. Необходима оценка стабильности субстанции и готовой формы препарата при хранении в условиях реального времени и стрессовых условиях. Результаты изучения стабильности в реальном времени в течение не менее 6 месяцев должны быть представлены в заявке на регистрацию препарата. Продление срока годности до 1 года необходимо обосновать данными изучения стабильности в условиях реального времени [17].

Стабильность и характеристика основных свойств, изученные в режиме реального времени, должны быть представлены в краткой характеристике лекарственного средства (SmPC). Эти исследования должны продемонстрировать, что вакцина соответствует требованиям специ-

фикации по критическим показателям качества в течение срока хранения.

Вакцины для профилактики пандемического гриппа. При развитии пандемии гриппа, которая официально признана ВОЗ или ЕМА, производители должны представить заявку на вакцину, содержащую штамм против пандемии гриппа. Набор необходимых документов для регистрации пандемических вакцин соответствует основным требованиям, предъявляемым при регистрации сезонных вакцин.

Живые вакцины на основе аттенуированных штаммов гриппа

Получение живых вакцин на основе аттенуированных штаммов отличается от производства инактивированных в первую очередь методами очистки. В процессе производства живых ослабленных вакцин должны использоваться высококачественные исходные материалы, от которых зависит качество препарата в плане его безопасности. Прежде всего это касается куриных эмбрионов для получения ослабленного реассортанта.

Сезонные живые вакцины на основе аттенуированных штаммов. В досье необходимо представить фенотипические и генетические свойства ослабленного исходного родительского штамма. Фенотипическая характеристика включает в себя исследования на маркеры, которые свидетельствуют об ослаблении вирулентной активности штамма. Оценка проводится *in vivo* и на адаптированных к холоду или чувствительных к температуре фенотипах (*in vitro*) для выявления ревертантов дикого типа. Обязательным условием является представление доказательства отсутствия нейровирулентной активности штамма, исследованной на моделях релевантных видов животных. При этом необходимо оценить не только потенциальную прямую нейровирулентность, но и косвенную, обусловленную вторичными инфекциями [18, 19].

Генотипическая характеристика родительского штамма включает:

- определение нуклеотидной последовательности полного генома вируса;
- данные о молекулярной основе аттенуированного фенотипа;
- данные, демонстрирующие генетическую стабильность ослабленного родительского штамма методом сравнения нуклеотидной последовательности генома вируса на разных уровнях пассажей.

Особое внимание следует уделить контролю посторонних агентов в соответствии с рекомендациями для оценки посторонних агентов вирусной, клеточной и микоплазменной природы [20, 21].

В основе производства живой вакцины лежит процесс получения посевного материала. Подробно должны быть описаны способ получения и условия хранения посевного материала, обоснованные данными о концентрации вируса, его генетической стабильности и стерильности. Если используется технология обратной генетики, проводится оценка кДНК банка клонов для 6 фрагментов РНК, которые являются производными от родительских штаммов (M, NS, NP, PA, PB1 и PB2) при производстве реассортанта.

Необходимо продемонстрировать систему оценки стабильности посевных серий и оценку показателей контроля качества при длительном хранении. Дополнительные испытания посевных партий ослабленного родительского штамма проводятся в соответствии с ЕФ, регламен-

тирующей контроль чужеродных агентов (стерильность, определение микоплазмы). При одобрении регуляторными органами эти исследования могут быть выполнены на уровне реассортантного рабочего посевного штамма.

Характеристики антигенов HA и NA донорского вируса осуществляются в соответствии с рекомендациями для сезонного гриппа. Для получения посевных серий должен быть использован сертифицированный субстратный материал (куриные эмбрионы, культуры клеток), который не должен содержать специфические патогены (SPF) [22]. Контроль готовых посевных серий проводится в соответствии с рекомендациями для выявления посторонних агентов донорских посевных штаммов. В дополнение к этим методикам могут быть разработаны тесты на основе ПЦР для выявления геномов респираторных агентов, которые могут быть реплицированы в субстрате, используемом для получения серий. Наличие микробной контаминации в посевном материале и штамме донора недопустимо.

Получение реассортантного штамма из родительского может быть выполнено классическим методом или методом обратной генетики. Данный этап получения штамма проводится с использованием сертифицированных реагентов (например, антисыворотки, ферментов), не содержащих инфекционные агенты. При использовании методов обратной генетики необходимо соблюдать общие требования руководства, регламентирующего перенос генов при получении лекарственных препаратов.

Для характеристики главного и рабочего посевного банков штаммов, так же как и для посевных серий, необходимо продемонстрировать присутствие маркеров, свидетельствующих о снижении патогенной активности вируса и о содержании HA и NA.

Характеристика балка моновалентной вакцины должна содержать информацию о маркерах, свидетельствующих о генетической стабильности и подтверждающих сохранение фенотипа ослабленного вируса.

Спецификация на балк трехвалентной вакцины (окончательная вакцина) должна содержать данные о специфической активности, содержании овальбумина и эндотоксинов, данные по оценке стабильности в режиме реального времени и при хранении в стрессовых условиях (повышенные температуры). Сроки и условия хранения должны быть обоснованы. Стабильность оценивается на основании положений соответствующей статьи ЕФ и руководства ICH Q5C.

Для определения специфической активности (стандартизации препарата), т.е. для определения количества активных вирусных частиц в дозе вакцины используют такие единицы, как инфекционный титр вируса, оцениваемый на куриных эмбрионах (EID₅₀), и титр вируса, оцениваемый на культуре ткани (TCID₅₀), или другие международные единицы, которые определяются с использованием соответствующего эталона вируса.

Процедура внесения изменений для сезонной замены штамма вакцины против гриппа. Учитывая уроки пандемии гриппа 2009–2010 гг., ЕМА внесла значительные изменения в документы, регламентирующие подачу заявки и процедуру ускоренной регистрации изменений, связанных с сезонным обновлением штамма вакцины против гриппа. В мае 2015 года ЕМА были утверждены нормативные требования, регламентирующие процедуру подачи заявки и получения лицензии на сезонные, препандемические и пандемические вакцины против гриппа (табл. 1). Согласно данному документу разработка новой сезонной вакцины осуществляется на основе стандартных требова-

ний, предъявляемых к биологическим препаратам. Ежегодное обновление сезонного штамма проводится по ускоренной процедуре [8].

Два раза в год (февраль и сентябрь) ВОЗ публикует рекомендации о предполагаемом штамме вируса, который может вызвать очередную сезонную эпидемию гриппа. Основываясь на рекомендациях ВОЗ и учитывая национальные особенности, ЕМА обычно в марте публикует свои рекомендации о штамме сезонного гриппа. На основе данных рекомендаций производители осуществляют замену сезонного штамма вакцины против гриппа и подают заявку на внесение изменений состава вакцины (обновление сезонного штамма).

В новом документе приведен перечень документов, которые необходимо представить вместе с заявлением, и четко прописаны сроки, регламентирующие процедуру регистрации изменений в связи с заменой сезонного штамма. Процедура сезонного обновления штамма проходит в два этапа. На первом этапе производитель представляет документы, в основном касающиеся вопросов качества нового штамма — его характеристики, а также характеристики производственного процесса получения вакцины с новым штаммом, характеристики субстанции и готовой формы препарата и др.

Требования к досье, касающиеся вопросов качества, при замене/обновлении сезонного штамма

Замена/обновление штамма инактивированных сезонных вакцин

При ежегодном обновлении штамма проводятся исследования, связанные только с вносимыми изменениями. Для нового штамма вируса требования к качеству соответствуют требованиям, предъявляемым к качеству инактивированных вакцин. При характеристике посевных серий необходимо учесть возможные риски, которые могут появиться в связи с обновлением штамма. Например, если для контроля посторонних примесей используется метод ПЦР, то эти данные должны быть включены в заявку на регистрацию.

В досье необходимо представить все процедуры, которые касаются оптимизации производственного процесса, связанные с обновлением штамма. При этом необходимо представить материалы валидации критических этапов производства, в первую очередь инактивации и расщепления. Эти материалы необходимо подтвердить данными контроля (включая оценку нейраминидазы) трех последовательных серий одновалентного балка в следующих случаях:

- если используется новый кандидат посевного материала;
- если процедура подготовки посевного материала отличается от ранее утвержденной.

В подобной ситуации необходимо представить материалы валидации аналитических методов, которые используются для характеристики обновления штамма (например, SRD).

Для обновленного штамма практически невозможно провести исследование стабильности в полном объеме. Поэтому для тех субстанций, которые используются более года, необходимо проведение исследований стабильности в режиме реального времени. Для готовой формы вакцинного препарата должны быть представлены програм-

ма проведения исследований стабильности и обязательство об изучении стабильности после регистрации изменений замены штамма.

Замена/обновление штамма препандемической (зоонозной) вакцины

Препандемические вакцины предназначены для иммунизации во время вспышки зоонозного гриппа с пандемическим потенциалом, включая пандемии, вызванные данным штаммом или сходным. Регистрация новой пандемической вакцины и внесение изменения в состав вакцины производятся по стандартной процедуре.

При низкой или незначительной перекрестной реактивности штамма вируса гриппа препандемической вакцины возникает необходимость его замены. Возможны два варианта замены штамма:

а) замена зарегистрированного штамма на другой подтип (например, замена одного подтипа H5N1 на другой подтип H5N1). В данной ситуации в досье должна быть представлена такая же информация, как и в случае обновления штамма сезонной вакцины;

б) замена подтипа HA/NA штамма (например, замена оригинального штамма H5N1 на H7N7). При этом ЕМА принимает решение о том, какие требования необходимо выполнить для внесения данных изменений, определяет какие данные и в каком объеме необходимо представить по результатам дополнительных доклинических и клинических исследований.

Замена/обновление штамма пандемической вакцины

Если при обновлении штамма используются материалы, информация о безопасности которых недостаточно известна, необходимо обеспечить оценки рисков. Любые изменения, касающиеся посевного штамма вируса в процессе производства пандемической вакцины (например, использование более продуктивного реассортантного вируса или введение дополнительных пассажей), должны быть обоснованы.

Любые различия (например, остаточное содержание деоксихолата натрия) устанавливаются в процессе исследований сопоставимости между вакцинами, полученными до и после замены штамма. При этом необходимо провести критический анализ относительно влияния выявленных различий на безопасность и иммуногенность вакцинного препарата. При установлении высокой степени различий может потребоваться представление дополнительных материалов.

Внесение изменений в производственный процесс (например, с целью интенсификации производства и повышения выхода продукции) должно быть обосновано и подтверждено. Для доказательства того, что внесенные изменения не влияют на иммуногенные свойства вакцины, необходимо проведение соответствующих исследований. Если данные об иммуногенности препарата для человека недоступны, результаты исследований иммуногенности, полученные на животных (как минимум одной серии препарата), могут служить обоснованием для внесения изменений.

Не стоит ожидать полной сопоставимости вакцинных препаратов до и после обновления штамма, однако критические показатели качества должны быть сопоставимы. Любые выявленные различия должны быть оценены с точки зрения их влияния на безопасность и иммуногенность вакцины.

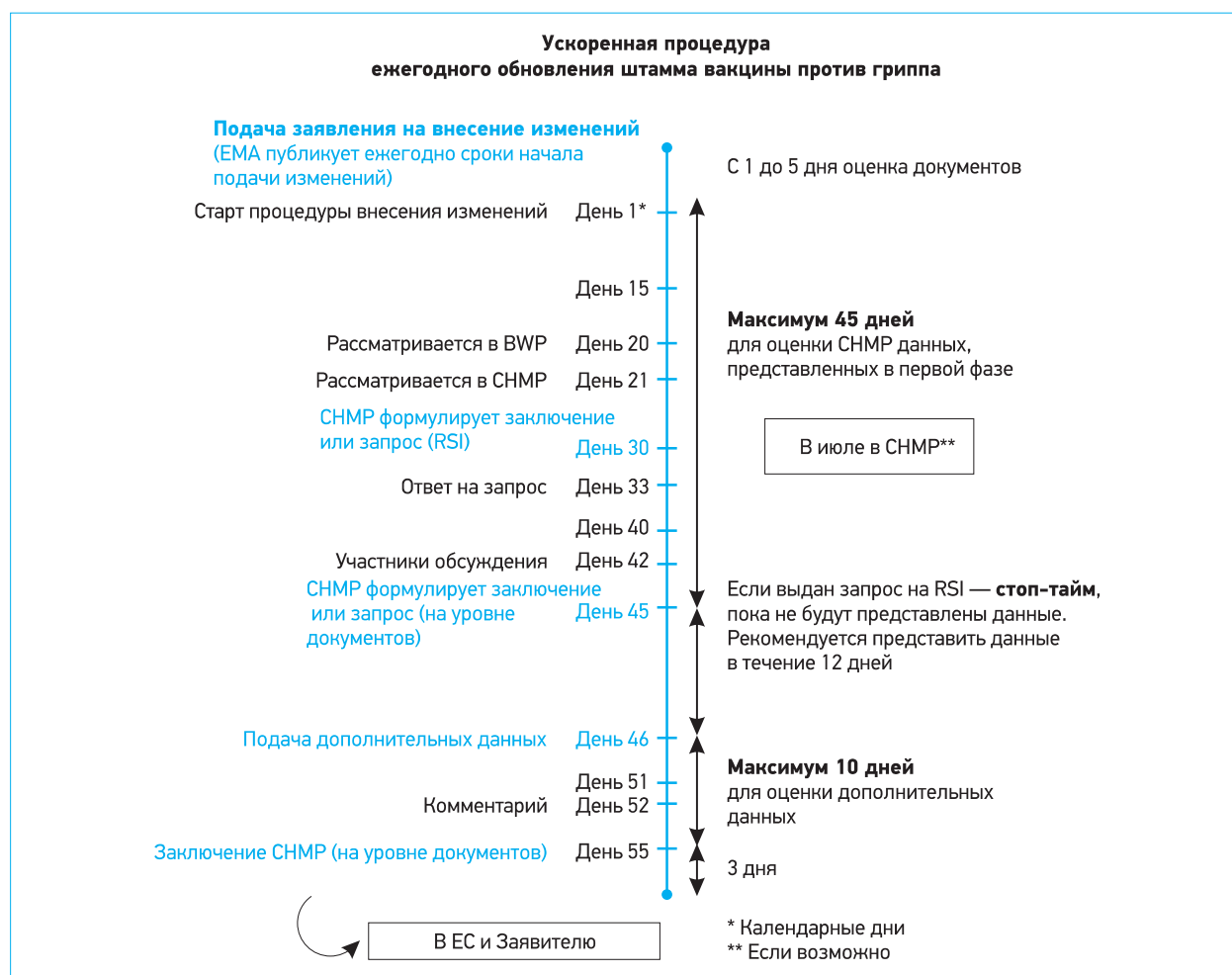


Рис. 1. Ускоренная процедура ежегодного обновления штамма вакцины против гриппа (EMA — Европейское медицинское агентство по лекарственным средствам, BWP — рабочая группа по биологическим препаратам EMA, CHMP — Комитет по медицинским препаратам для человека EMA) [8].

В досье на замену пандемического штамма должны быть включены результаты испытаний стабильности субстанции и готовой формы препарата. Полные данные о стабильности (изучение в условиях реального времени) не могут быть представлены при замене штамма. В этом случае представляются данные сравнительного изучения стабильности препаратов в стрессовых условиях хранения до и после замены штаммов.

Замена/обновление сезонного штамма живой вакцины против гриппа, полученной из аттенуированного штамма

При подаче заявки на сезонное обновление штамма живой вакцины из аттенуированного штамма в модуль досье по качеству необходимо представить в первую очередь информацию о штамме.

Описание получения посевного материала должно включать:

- описание получения посевного исходного образца штамма — донора аттенуации вируса гриппа и рекомендованного ВОЗ штамма;
- историю пассажей;
- генетическую характеристику посевного штамма;
- фенотипическую характеристику, включая исследование маркеров аттенуации (*in vivo*) и фенотипов, адапти-

рованных к холоду или чувствительных к температуре (*in vitro*), которая проводится для выявления ревертантов дикого типа, а также методы для идентификации HA и NA;

- данные о генетической стабильности посевных серий, включая определение соответствующих генотипических и фенотипических маркеров (например, полная генетическая характеристика);

– протоколы аналитических исследований (включая оценку безопасности и наличия посторонних агентов). Если в посевных сериях наличие посторонних включений установлено с помощью ПЦР, то результаты этих дополнительных исследований должны быть включены в досье;

- оценка нейровирулентности нового штамма (штамма с антигенным дрейфом), как правило, не требуется, однако она необходима в случае использования нового подтипа вируса гриппа А (например, не H1 или не H3 подтипы) или нового типа вируса гриппа В.

В досье должны быть описаны и обоснованы любые изменения производственного процесса, связанные с заменой сезонного штамма. Необходимо оценить критические этапы производства для нового сезонного штамма. При этом необходимо представить результаты испытаний первых серий моновалентных балков и серий готового вакцинного препарата.

Необходимо представить валидацию аналитических процедур, которые связаны с изменением штамма, например, процедуры оценки активности. Показатели, включенные в спецификацию, и аналитические методы должны быть представлены в виде таблицы.

Если одновалентные балки используются больше одного года, то необходимо представить материалы изучения его стабильности. Досье должно включать протокол изучения стабильности в режиме реального времени в пострегистрационном периоде.

Значения срока годности, указанные в спецификации, должны быть подтверждены результатами изучения стабильности нового штамма в стрессовых условиях хранения (условия «ускоренного старения»).

Этапы ускоренной процедуры регистрации замены/обновления сезонного штамма вакцины против гриппа

Ускоренная процедура регистрации распространяется только на изменения, касающиеся замены/обновления сезонного штамма, регистрация других изменений проводится по стандартной процедуре. Процедура регистрации изменений при замене сезонного штамма проводится в два этапа.

На первом этапе продолжительностью 45 дней проводится оценка представленных материалов, характеризующих качество вакцины. При этом эксперты на основании изучения документов могут сделать следующие заключения: утвердить вносимые изменения, отклонить вносимые изменения или сделать запрос для представления дополнительных данных.

Если экспертная организация выдает положительное заключение о замене/обновлении сезонного штамма вакцины, то процедура регистрации проходит в течение 45 дней и ограничивается только первым этапом.

Если формируется запрос о представлении дополнительных данных, то процедура регистрации приостанавливается («стоп-тайм») сроком до 30 дней и переходит во второй этап. При этом заявителю рекомендуется представить запрашиваемые данные в течение 12 дней, а затем в течение 10 дней экспертное учреждение готовит окончательное заключение (рис. 1).

Запрос на представление дополнительных материалов может включать не только материалы, касающиеся характеристики качества, но и данные клинических исследований вакцин против гриппа [7]. Оптимальным сроком подачи заявки будет тот период, который позволит провести экспертизу представленных материалов в июле.

Особенности регистрации пандемических вакцин против гриппа

При появлении только признаков пандемии гриппа заявитель может разработать и лицензировать так называемую «вакцину готовности к пандемии» («pandemic preparedness vaccine»). Данный тип вакцины обычно основан на принципе модуля (mock-up) (модель в натуральную величину), который позволяет полностью имитировать вакцину против штамма пандемического гриппа.

При этом заявитель представляет так называемое «досье для пандемической вакцины». Если к этому времени пандемия признана ВОЗ или на уровне ЕС, подается заявка для лицензирования препарата «установленного пандемического штамма», которая рассматривается по ус-

коренной процедуре. Кроме того, заявитель представляет заявление и материалы так называемого «досье для пандемии», которое содержит информацию о соответствующем пандемическом штамме. Естественно, что в условиях пандемии невозможно подготовить полноценное досье, поэтому «досье для пандемии» будет содержать неполную информацию, которая предоставляется при лицензировании.

В данной ситуации препарат будет зарегистрирован на основании требований «условной лицензии», с условием, что заявитель представит отсутствующие данные позже и включит их в досье. Если заявителем не обосновано проведение ускоренной процедуры, то проводится стандартная процедура регистрации.

Если ВОЗ или ЕС официально признали пандемию гриппа, но у производителя появилась обоснованная необходимость изменения пандемического штамма, то заявитель может подать заявление об изменении пандемического штамма с отсутствующими некоторыми доклиническими и клиническими данными. В последующем заявитель обязан предоставить недостающие доклинические и клинические данные в сроки, оговоренные в лицензии на препарат. При необходимости регистрация проводится по ускоренной процедуре.

Последние пандемии гриппа выявили проблемы и некоторые слабые стороны, связанные с обеспечением здравоохранения актуальными вакцинами. Это потребовало пересмотра требований, регламентирующих оценку качества и регистрацию вакцин в условиях ограниченного периода времени. ЕМА в 2014–2016 гг. были пересмотрены основные требования для оценки качества, проведения доклинических и клинических исследований и процедуры регистрации по ускоренной схеме. В настоящее время в нашей стране проводится подготовка нормативных требований для оценки качества, проведения доклинических и клинических исследований и процедуры регистрации по ускоренной схеме для стран Евразийского экономического Союза (ЕАЭС). Подготовка нормативных требований для ЕАЭС потребует и пересмотра отечественного законодательства по данному вопросу. При этом опыт, накопленный ЕМА, может быть полезным при подготовке отечественной нормативной базы, что позволит повысить эффективность и безопасность вакцин против гриппа.

Литература

1. Щелканов МЮ, Львов ДК. Генотипическая структура рода *Influenza A virus*. Вестник РАМН. 2011; (5): 19–23.
2. Колобухина ЛВ, Щелканов МЮ, Меркулова ЛН, Базарова МВ, Бурцева ЕИ, Самохвалов ЕИ и др. Этиотропная терапия гриппа: уроки последней пандемии. Вестник РАМН. 2011; (5): 35–40.
3. Гендон ЮЗ. Свиной грипп H1N1/Калифорния — страсти и факты. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии 2010; (4): 105–14.
4. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science 2009; 325(5937): 197–201.
5. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. Nature 2009; 459(7250): 1122–5.
6. Guideline on influenza vaccines — quality module (25 April 2014. EMA/CHMP/BWP/310834/2012). Available from: <https://goo.gl/xOnHht>.
7. Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module (21 July 2016. EMA/CHMP/VWP/457259/2014). Available from: <https://goo.gl/6AoNPn>.

8. *Guideline on influenza vaccines — submission and procedural requirements. Regulatory and procedural requirements module.* (May 2015 EMA/56793/2014). Available from: <https://goo.gl/Yly7zd>.
9. *Vaccines for human use. European Pharmacopoeia 9.0.* Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
10. *Influenza vaccine (split virion, inactivated). European Pharmacopoeia 9.0.* Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
11. *Influenza vaccine (surface antigen, inactivated). European Pharmacopoeia 9.0.* Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
12. *Influenza vaccine (whole virion, inactivated). European Pharmacopoeia 9.0.* Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
13. *Influenza vaccine (surface antigen, inactivated, virosome). European Pharmacopoeia 9.0.* Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
14. *Influenza vaccine (whole virion, inactivated, prepared in cell cultures). European Pharmacopoeia 9.0.* Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
15. *Influenza vaccine (surface antigen, inactivated, prepared in cell cultures). European Pharmacopoeia 9.0.* Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
16. *WHO biosafety risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines.* WHO Technical Report Series No 941, 2007 Annex 5.
17. *Q5C Note for Guidance on Quality of Biotechnological Products: Stability testing of biotechnological/biological products (CPMP/ICH/138/95).*
18. *2.6.18. Tests for neurovirulence of live virus vaccines. European Pharmacopoeia 9.0.* Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
19. Ward AC. Neurovirulence of influenza A virus. *J Neurovirol.* 1996; 2(3): 139–51.
20. World Health Organization. WHO Technical Report Series, No. 927, 2005 Annex 4. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals (Addendum 2003). Available from: <https://goo.gl/f1J3w0>.
21. CPMP Note for guidance on virus validation studies. The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (CPMP/BWP/268/95). Available from: <https://goo.gl/GepjYR>.
22. *5.2.2. Chicken flocks free from specified pathogens for the production and quality control of vaccines. European Pharmacopoeia 9.0.* Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.

Об авторах

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

Солдатов Александр Алексеевич. Главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук.

Авдеева Жанна Ильдаровна. Главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Солдатов Александр Алексеевич; Soldatov@expmed.ru

Update of influenza vaccine strains in Europe. Quality issues

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

Federal State Budgetary Institution

«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»

of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

In 2009–2010 there was an influenza pandemic that occurred despite all preventive measures. Analysis of this pandemic revealed some gaps in the regulatory requirements applied both to the development of new influenza vaccines and to the change/update of the seasonal influenza vaccine strains. Taking into account the lessons learned from this pandemic the European Medicines Agency revised the existing guidelines in 2014–2016 and proposed new recommendations on quality evaluation and conduct of non-clinical and clinical trials in the development of influenza vaccines. The revised requirements encompass not only quality evaluation issues, but also changes/update of strain composition of seasonal, pre-pandemic and pandemic influenza vaccines. The experience acquired by the Agency can help update the Russian regulatory framework in order to improve efficacy and safety of influenza vaccines.

Key words: influenza vaccines (seasonal, pandemic, pre-pandemic); attenuated vaccines (attenuated vaccine strains); seasonal strain change.

For citation: Soldatov AA, Avdeeva Zhi, Bondarev VP. Update of influenza vaccine strains in Europe. Quality issues. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(1): 3–12.

References

1. Shchelkanov MYu, Lvov DK. Genotypic structure of the genus Influenza A virus. *Annals of the Russian academy of medical sciences* 2011; (5): 19–23 (in Russian).
2. Kolobukhina LV, Shchelkanov MYu, Merkulova LN, Bazarova MV, Burtseva EI, et al. Etiotropic therapy of influenza: lessons from the last pandemic. *Annals of the Russian academy of medical sciences* 2011; (5): 35–40 (in Russian).
3. Ghendon YuZ. Swine-origin influenza H1N1 / California — passions and facts. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology* 2010; (3): 105–14 (in Russian).
4. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009; 325(5937): 197–201.
5. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 2009; 459(7250): 1122–5.
6. *Guideline on influenza vaccines — quality module* (25 April 2014. EMA/CHMP/BWP/310834/2012). Available from: <https://goo.gl/xOnHht>.

7. *Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module* (21 July 2016. EMA/CHMP/VWP/457259/2014). Available from: <https://goo.gl/6AoNPn>.
8. *Guideline on influenza vaccines — submission and procedural requirements. Regulatory and procedural requirements module*. (May 2015 EMA/56793/2014). Available from: <https://goo.gl/Yly7zd>.
9. *Vaccines for human use. European Pharmacopoeia 9.0*. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
10. *Influenza vaccine (split virion, inactivated). European Pharmacopoeia 9.0*. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
11. *Influenza vaccine (surface antigen, inactivated). European Pharmacopoeia 9.0*. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
12. *Influenza vaccine (whole virion, inactivated). European Pharmacopoeia 9.0*. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
13. *Influenza vaccine (surface antigen, inactivated, virosome). European Pharmacopoeia 9.0*. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
14. *Influenza vaccine (whole virion, inactivated, prepared in cell cultures). European Pharmacopoeia 9.0*. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
15. *Influenza vaccine (surface antigen, inactivated, prepared in cell cultures). European Pharmacopoeia 9.0*. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
16. *WHO biosafety risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines. WHO Technical Report Series No 941, 2007 Annex 5*.
17. *Q5C Note for Guidance on Quality of Biotechnological Products: Stability testing of biotechnological/biological products (CPMP/ICH/138/95)*.
18. *2.6.18. Tests for neurovirulence of live virus vaccines. European Pharmacopoeia 9.0*. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
19. Ward AC. Neurovirulence of influenza A virus. *J Neurovirol.* 1996; 2(3): 139–51.
20. World Health Organization. WHO Technical Report Series, No. 927, 2005 Annex 4. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals (Addendum 2003). Available from: <https://goo.gl/f1J3w0>.
21. CPMP Note for guidance on virus validation studies. The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (CPMP/BWP/268/95). Available from: <https://goo.gl/GepjYR>.
22. 5.2.2. Chicken flocks free from specified pathogens for the production and quality control of vaccines. *European Pharmacopoeia 9.0*. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation. Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Soldatov AA. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Allergenes, Cytokines and other Immunomodulators of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences.

Avdееva ZhI. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Allergenes, Cytokines and other Immunomodulators of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Bondarev VP. Director of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.