

БИО ПРЕПАРАТЫ

ISSN 2221-996X (Print)
ISSN 2619-1156 (Online)

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал
федерального государственного бюджетного учреждения
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Том 21, № **3**
Июль — сентябрь 2021



BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment

В НОМЕРЕ

Взаимозаменяемость вакцин: проблемы и перспективы

Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19
лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2

Включен в наукометрическую базу данных Science Index
on-line версия журнала www.biopreparations.ru

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

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

Пятилетний импакт-фактор РИНЦ — 0,544.

К публикации принимаются статьи, подготовленные в соответствии с правилами для авторов, размещенными на сайте журнала www.biopreparations.ru.

Все статьи проходят рецензирование не менее чем двумя рецензентами.
Используется модель двойного слепого рецензирования.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается.
Ускоренная публикация не допускается.

Материалы заочных конференций не публикуются.

Воспроизведение или использование другим способом любой части издания без ссылки на журнал является незаконным и влечет за собой ответственность, установленную действующим законодательством Российской Федерации.

ISSN 2221-996X (Print)
ISSN 2619-1156 (Online)

БИО ПРЕПАРАТЫ

**ПРОФИЛАКТИКА,
ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ**

Рецензируемый научно-практический журнал
федерального государственного бюджетного учреждения
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Том 21, № 3
Июль — сентябрь 2021

BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie
[**BIO**preparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]

Peer-reviewed scientific and practical journal of
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Volume 21, No. 3
July — September 2021

«БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» — журнал ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Создан в 2001 г. как периодическое научное издание Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л. А. Тарасевича. В журнале публикуются статьи по вопросам разработки, стандартизации, контроля качества, производства, регистрации и применения биологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов; профилактики, диагностики и лечения инфекционных, аллергических и иммунопатологических процессов; разработки, совершенствования и применения новых технологий с целью получения медицинских биологических препаратов.

В журнале публикуются обзорные и оригинальные статьи, область исследований которых соответствует медицинской и биологической отраслям науки и научным специальностям: **Физико-химическая биология** (Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), Молекулярная генетика, Биотехнология); **Клиническая медицина** (Педиатрия, Инфекционные болезни, Фтизиатрия); **Медико-биологические науки** (Фармакология, клиническая фармакология, Химиотерапия и антибиотики, Клиническая иммунология, аллергология, Клиническая лабораторная диагностика).



Л. А. Тарасевич

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Хаитов Муса Рахимович, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН,
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доц., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф.,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Амвросьева Тамара Васильевна, д-р мед. наук, проф.,
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Республика Беларусь)

Аракелов Сергей Александрович, канд. биол. наук,
ФГУП СПбНИИВС ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия)

Бакулин Михаил Константинович, д-р мед. наук, проф.,
филиал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров, Россия)

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф.,
ФМБА России (Москва, Россия)

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук,
проф., член-корр. РАН, ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны
России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

Брико Николай Иванович, д-р мед. наук, проф., ака-
демик РАН, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Москва, Россия)

Валента Рудольф, проф., Венский медицинский
университет (Вена, Австрия)

Гинцбург Александр Леонидович, д-р биол. наук,
проф., академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России (Москва, Россия)

Дармов Илья Владимирович, д-р мед. наук, проф., фили-
ал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров, Россия)

Дегтярев Сергей Харитонович, д-р биол. наук, проф.,
НПО «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия)

Дятлов Иван Алексеевич, д-р мед. наук, проф., академик
РАН, ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk, Московская область, Россия)

Зверев Виталий Васильевич, д-р биол. наук, проф.,
академик РАН, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сечено-
ва Минздрава России (Москва, Россия)

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

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф.,
ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Москва,
Россия)

ШЕФ-РЕДАКТОР

Федотова Ольга Федоровна, ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКТОР ПЕРЕВОДА

Губарева Ольга Николаевна, канд. филол. наук,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Климов Владимир Иванович, канд. мед. наук, ст. науч.
сотр., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва,
Россия)

Кутырев Владимир Викторович, д-р мед. наук, проф.,
академик РАН, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотреб-
надзора (Саратов, Россия)

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, проф.,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Львов Дмитрий Константинович, д-р мед. наук, проф.,
академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Мин-
здрава России (Москва, Россия)

Медуницын Николай Васильевич, д-р мед. наук, проф.,
академик РАН (Москва, Россия)

Миронов Александр Николаевич, д-р мед. наук, проф.,
ООО «Национальное агентство лекарственных средств»
(Москва, Россия)

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

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

Пашенко Юрий Иванович, д-р биол. наук, проф.,
ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад,
Московская область, Россия)

Токарев Николай Константинович, д-р мед. наук,
проф., ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии име-
ни Пастера (Санкт-Петербург, Россия)

Хаитов Рахим Мусаевич, д-р мед. наук, проф., академик
РАН, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России
(Москва, Россия)

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф.,
АО «Генериум» (Вольгинский, Владимирская область,
Россия)

Чумаков Константин Михайлович, д-р биол. наук,
проф., Управление по контролю за качеством продуктов
питания и лекарственных средств (Силвер-Спринг,
Мэриленд, США)

НАУЧНЫЕ РЕДАКТОРЫ

Гукасова Надежда Вадимовна, канд. биол. наук,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Лебединская Елена Владимировна, канд. биол. наук,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment is a journal published by the Federal State Budgetary Institution Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation. It was founded in 2001 as a scientific journal of L. A. Tarasevich State Scientific Research Institute for Standardisation and Control of Biological Products. The journal covers such issues as development, standardisation, quality control, production, authorisation, and use of biological products and biomedical cell products; prevention, diagnosis, and treatment of infectious diseases, allergic diseases, and immunopathological conditions; development, improvement, and use of new technologies for the production of biological products.

The journal publishes original research articles and reviews pertaining to biological and medical areas of research and one of the following special-ist fields: **Physicochemical biology** (Biotechnology (including bionanotechnology), Molecular genetics, Bioengineering); **Clinical Medicine** (Pediatrics, Infectious diseases, Phthisiology); **Medical and Life Sciences** (Pharmacology, clinical pharmacology, Chemotherapy and antibiotics, Clinical immunol-ogy, allergology, Clinical pathology).

EDITOR-IN-CHIEF

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITORS-IN-CHIEF

Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Musa R. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of RAS, National Research Center "Institute of Immunology" (Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

MEMBERS OF THE EDITORIAL BOARD

Zhanna I. Avdeeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Tamara V. Amvroseyeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (Minsk, Republic of Belarus)

Sergey A. Arakelov, Cand. Sci. (Biol.), Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations (Saint Petersburg, Russia)

Mikhail K. Bakulin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Federal Medical Biological Agency of Russia (Moscow, Russia)

Sergey V. Borisevich, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Corr. Member of RAS, 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

Nikolay I. Briko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Rudolf Valenta, MD, Prof., Medical University of Vienna (Vienna, Austria)

Aleksandr L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

Ilya V. Darmov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

Sergey Kh. Degtyarev, Dr. Sci. (Biol.), Prof., SibEnzyme Ltd (Novosibirsk, Russia)

Ivan A. Dyatlov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology (Obolensk, Moscow Region, Russia)

Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Vyacheslav B. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Chumakov FSC R&D IBP RAS (Moscow, Russia)

Vladimir I. Klimov, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Associate, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vladimir V. Kutyrev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" (Saratov, Russia)

Diana T. Levi, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Dmitry K. Lvov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

Nikolay V. Medunitsyn, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

Aleksandr N. Mironov, Dr. Sci. (Med.), Prof., National Agency of Medicines (Moscow, Russia)

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vyacheslav D. Mosyagin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Yuriy I. Pashchenko, Dr. Sci. (Biol.), Prof., 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

Nikolay K. Tokarevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint-Petersburg Pasteur Institute (Saint Petersburg, Russia)

Rakhim M. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, National Research Center "Institute of Immunology" (Moscow, Russia)

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Generium JSC (Volginsky, Vladimir Region, Russia)

Konstantin M. Chumakov, Dr. Sci. (Biol.), PhD, Food and Drug Administration (Silver Spring, Maryland, USA)

MANAGING EDITOR

Olga F. Fedotova, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

TRANSLATION EDITOR

Olga N. Gubareva, Cand. Sci. (Philology), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

SCIENCE EDITORS

Nadezhda V. Gukasova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Elena V. Lebedinskaya, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

БИОПРЕПАРАТЫ

Том 21, № 3

Июль — сентябрь 2021

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Взаимозаменяемость вакцин: проблемы и перспективы

Н. А. Гаврилова, Ю. В. Олефир, В. А. Меркулов, В. П. Бондарев, Е. М. Рычихина, Ю. И. Обухов 142

Сравнительная характеристика вакцин против COVID-19, используемых при проведении массовой иммунизации

Г. Г. Онищенко, Т. Е. Сизикова, В. Н. Лебедев, С. В. Борисевич 158

Мировая практика научного консультирования по вопросам разработки и регистрации инновационных препаратов

Е. В. Мельникова, О. В. Меркулова, В. А. Меркулов. 167

Оригинальные статьи

Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2

Д. А. Потеряев, С. Г. Аббасова, П. Е. Игнатьева, О. М. Стрижакова, С. В. Колесник, Р. А. Хамитов 178

Разработка и аттестация стандартных образцов содержания фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах с учетом сопоставимости результатов, полученных методами ГЖХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии и колориметрии

О. Н. Колесникова, О. В. Фадейкина, О. Б. Устинникова, Р. А. Волкова, А. А. Мовсисянц 193

Разработка технологии приготовления ферментативного гидролизата отработанных куриных эмбрионов

Ю. С. Овсянников, М. С. Дурсенев 200

Хроника

Дмитрий Константинович Львов (к 90-летию со дня рождения) 206

Журнал «Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций

Свидетельство ПИ № ФС77-53128 от 14 марта 2013 г.

Учредитель: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Адрес учредителя и редакции: 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2

Подписной индекс в каталоге «Пресса России» — Т57941,
агентства «Урал-Пресс» — 57941. Тираж 100 экз. Цена свободная

Издатель ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

Типография «Ситипринт»: 129226, Москва, ул. Докукина, д. 10

Подписано в печать: 30.09.2021

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

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

CONTENTS

Reviews

Vaccine interchangeability: problems and prospects

N. A. Gavrilova, Yu. V. Olefir, V. A. Merkulov, V. P. Bondarev, E. M. Rychikhina, Yu. I. Obukhov 142

Comparative characteristics of COVID-19 vaccines used for mass immunisation

G. G. Onishchenko, T. E. Sizikova, V. N. Lebedev, S. V. Borisevich 158

World practice of providing scientific advice on the development and authorisation of innovative medicines

E. V. Melnikova, O. V. Merkulova, V. A. Merkulov 167

Original Articles

Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects, using TigraTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit

D. A. Poteryaev, S. G. Abbasova, P. E. Ignatyeva, O. M. Strizhakova, S. V. Kolesnik, R. A. Khamitov 178

Development and certification of reference standards for phenolic content in biologicals, based on comparison of results obtained by GLC, HPLC, spectrophotometric, and colorimetric methods

O. N. Kolesnikova, O. V. Fadeikina, O. B. Ustinnikova, R. A. Volkova, A. A. Movsesyants 193

Development of the technology for preparation of enzymatic hydrolysate of waste chick embryos

Yu. S. Ovsyannikov, M. S. Dursenev 200

Chronicle

Dmitry Konstantinovich Lvov (on the 90th Anniversary) 206

Journal *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* is registered
in the Federal Service for Supervision of Communications,
Information Technologies and Mass Communications

Certificate PI No. FS77-53128 dated 14 March 2013

Founder: Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products"
of the Ministry of Health of the Russian Federation

Postal address of the founder and editorial office: 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051

Subscription codes are provided in the catalogues of *Pressa Rossii*—T57941
and *Ural-Press* agency—57941. Print run: 100 copies. Free price

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

Printing office Cityprint: 10 Dokukin St., Moscow 129226

Passed for printing: 30 September 2021

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

Взаимозаменяемость вакцин: проблемы и перспективы

Н. А. Гаврилова^{1,*}, Ю. В. Олефир¹, В. А. Меркулов^{1,2}, В. П. Бондарев¹, Е. М. Рычихина¹, Ю. И. Обухов¹

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

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

Для большинства управляемых инфекций, профилируемых в рамках национального календаря профилактических прививок Российской Федерации, применяются вакцины различных производителей. Актуальной проблемой является установление возможности замены вакцины в случае плановой или экстренной вакцинации. Цель работы — обоснование проблемы взаимозаменяемости вакцин, ее особенностей и подходов к решению, анализ критериев, регламентирующих экспертную оценку взаимозаменяемости вакцин в России, и международного опыта по данному вопросу. Начиная с 2020 г. порядок определения взаимозаменяемости для биологических лекарственных препаратов, к которым относятся вакцины, утвержден согласно положениям Постановления Правительства Российской Федерации от 05.09.2020 № 1360 «О порядке определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения». В обзоре представлен анализ применимости установленных законодательно критериев взаимозаменяемости биологических лекарственных препаратов, в том числе вакцин. Сформулированы основные проблемы, связанные с проведением экспертной оценки взаимозаменяемости вакцин в соответствии с установленными критериями. Сделан вывод о необходимости уточнения критериев взаимозаменяемости вакцин для оценки сопоставимости фармацевтических субстанций и оценки сопоставимой эффективности, безопасности и иммуногенности с учетом схем вакцинаций для разных возрастных групп, возможности оценки взаимозаменяемости по результатам пострегистрационных исследований, а также необходимости приведения в соответствие инструкций по медицинскому применению взаимозаменяемых вакцин.

Ключевые слова: вакцины; взаимозаменяемость; моновакцины; комбинированные вакцины; антиген; клинические исследования; иммуногенность; эффективность

Для цитирования: Гаврилова НА, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Бондарев ВП, Рычихина ЕМ, Обухов ЮИ. Взаимозаменяемость вакцин: проблемы и перспективы. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(3):142–157. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-142-157

* **Контактное лицо:** Гаврилова Наталья Андреевна; gavrilo@expmed.ru

Vaccine interchangeability: problems and prospects

N. A. Gavrilova^{1,*}, Yu. V. Olefir¹, V. A. Merkulov^{1,2}, V. P. Bondarev¹, E. M. Rychikhina¹, Yu. I. Obukhov¹

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

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

Vaccines by different manufacturers are available for most of the vaccine-preventable infections covered by the National Immunisation Schedule of the Russian Federation. Determination of the possibility of replacing a vaccine in the case of routine or emergency vaccination still remains a challenging issue. The aim of the study was to substantiate the problem of vaccine interchangeability, outline specific challenges and ways of solving them, analyse criteria underlying evaluation of vaccine interchangeability in Russia, and international experience in this area. The procedure for determining the interchangeability of biological products, including vaccines, was established in the Decree of the Government of the Russian Federation of 5 September 2020, No. 1360 “On the procedure for determination of interchangeability of medicinal products for human use”. The paper analyses the applicability of the official criteria for interchangeability of biological products, including vaccines. It outlines the main problems of performing evaluation of vaccine interchangeability in accordance with the established criteria. It is concluded that the vaccine interchangeability criteria need to be clarified in order to allow for assessment of comparability of active substances, and comparison of efficacy, safety, and immunogenicity of vaccines, taking into account vaccination schedules for different age groups. The possibility of evaluating interchangeability based on the results of post-authorisation studies also needs clarification. It is also necessary to align patient information leaflets for interchangeable vaccines.

Key words: vaccines; interchangeability; monovaccines; combination vaccines; antigen; clinical studies; immunogenicity; efficacy

For citation: Gavrilova NA, Olefir YuV, Merkulov VA, Bondarev VP, Rychikhina EM, Obukhov Yul. Vaccine interchangeability: problems and prospects. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(3):142–157. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-142-157

* **Corresponding author:** Natalia A. Gavrilova; gavrilo@expmed.ru

Определение взаимозаменяемости вакцин имеет актуальное значение в рамках реализации национальных календарей профилактических прививок. Это связано с рядом объективных причин. Для большинства управляемых инфекций, профилактируемых в рамках национального календаря профилактических прививок Российской Федерации¹, применяются вакцины различных производителей. Круг вакцин для профилактики одних и тех же инфекций постоянно расширяется за счет создания новых комбинаций антигенов, разработки более эффективных адъювантов и новых лекарственных форм. При отсутствии вакцины определенного торгового наименования, противопоказаниях для применения конкретной вакцины, иммунизации лиц с неизвестным прививочным анамнезом может возникнуть необходимость применения в течение одного или нескольких последовательных курсов иммунизации вакцин разных производителей. В связи с этим актуальной проблемой является установление возможности замены вакцины в случае проведения курса плановой или экстренной вакцинации.

Понятие «взаимозаменяемость» («interchangeability») впервые появилось в связи с массовым производством воспроизведенных и биоаналоговых лекарственных препаратов, призванных заменить в клинической практике дорогостоящие оригинальные препараты и повысить доступность лекарственной терапии². Стратегия взаимозаменяемости не является новой и отражена в национальных руководствах и научных публикациях по вакцинопрофилактике ряда стран³ [1, 2]. Согласно определению российского законодательства, взаимозаменяемый лекарственный препарат — это препарат с доказанной терапевтической или биоэквивалентностью в отношении референтного препарата, имеющий эквивалентные ему состав действующих и вспомогательных веществ, лекарственную форму и способ введения⁴. До 2020 г.

отсутствовал приемлемый подход к оценке взаимозаменяемости вакцин как особой группы лекарственных препаратов (ЛП); неприменимость к вакцинам понятия «терапевтической эквивалентности» затрудняла распространение на них термина «взаимозаменяемость» [1]. Начиная с 2020 г. порядок определения взаимозаменяемости для биологических ЛП, к которым относятся вакцины, определяется согласно положениям Правил определения взаимозаменяемости ЛП для медицинского применения, утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 05.09.2020 № 1360 «О порядке определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения»⁵. В документе определены критерии, которые используются при экспертной оценке взаимозаменяемости вакцин. Применение концепции взаимозаменяемости важно при назначении ЛП медицинскими работниками, а также при описании ЛП, являющихся объектом закупки для обеспечения государственных и муниципальных нужд⁶. К таким ЛП относятся в том числе и вакцины, применяемые для профилактики инфекций в соответствии с национальным календарем профилактических прививок Российской Федерации⁷.

Нормативно-правовая база по оценке взаимозаменяемости ЛП⁸ в России устанавливает общие критерии оценки взаимозаменяемости ЛП, в том числе вакцин, определяет порядок установления взаимозаменяемости, но не содержит разъяснений о применимости установленных критериев взаимозаменяемости к вакцинам с учетом особенностей их состава и механизма действия.

Цель работы — обоснование проблемы взаимозаменяемости вакцин, ее особенностей и подходов к решению, анализ критериев, регламентирующих экспертную оценку взаимозаменяемости вакцин в России, и международного опыта по данному вопросу.

¹ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21.03.2014 № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям».

² <https://www.fda.gov/drugs/biosimilars/biosimilar-and-interchangeable-products>

³ Kroger A, Bahta L, Hunter P. General best practice guidelines for immunization. Best practices guidance of the advisory committee on immunization practices (ACIP). www.cdc.gov/vaccines/hcp/acip-recs/general-recs/downloads/general-recs.pdf
<https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/healthy-living/canadian-immunization-guide-part-1-key-immunization-information/page-7-principles-vaccine-interchangeability.html>

Salisbury D, Ramsay M, Noakes K, eds. Immunisation against infectious disease. TSO, The Stationery Office; 2006. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/223734/Green-Book-updated-170713.pdf
<https://immunisationhandbook.health.gov.au/vaccine-preventable-diseases/>

⁴ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

⁵ Правила определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 05.09.2020 № 1360 «О порядке определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения»).

⁶ Постановление Правительства Российской Федерации от 04.09.2020 № 1357 «Об утверждении Правил использования информации о взаимозаменяемых лекарственных препаратах для медицинского применения и дачи разъяснений по вопросам взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения, а также о внесении изменения в особенности описания лекарственных препаратов для медицинского применения, являющихся объектом закупки для обеспечения государственных и муниципальных нужд».

⁷ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21.03.2014 № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям».

⁸ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

Правила определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 05.09.2020 № 1360 «О порядке определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения»).

Постановление Правительства Российской Федерации от 01.10.2020 № 1583 «Об утверждении Правил обращения воспроизведенных лекарственных препаратов, биоаналоговых (биоподобных) лекарственных препаратов (биоаналогов) до окончания срока, установленного для проведения исследований их биоэквивалентности или терапевтической эквивалентности либо внесения изменений в инструкцию по медицинскому применению в рамках определения взаимозаменяемости».

Постановление Правительства Российской Федерации от 04.09.2020 № 1357 «Об утверждении Правил использования информации о взаимозаменяемых лекарственных препаратах для медицинского применения и дачи разъяснений по вопросам взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения, а также о внесении изменения в особенности описания лекарственных препаратов для медицинского применения, являющихся объектом закупки для обеспечения государственных и муниципальных нужд».

Концепция взаимозаменяемости вакцин в Российской Федерации и аспекты ее применения в рамках национального календаря профилактических прививок

В таблице 1 представлены вакцины для профилактики бактериальных и вирусных инфекций у детей первого года жизни, зарегистрированные в Российской Федерации. Для профилактики каждой из инфекций зарегистрировано не менее двух вакцин. Это и вакцины с одним торговым наименованием разных производителей (например, вакцины БЦЖ, БЦЖ-М, АКДС), и моновакцины разных производителей, полученные на основе одного вида или серологического варианта возбудителя заболевания (например, вакцины для профилактики гепатита В) или изготовленные на основе нескольких серологических вариантов возбудителя заболевания (например, вакцины для профилактики пневмококковой инфекции), и комбинированные вакцины с разными группировочными наименованиями, содержащие антигены для профилактики не менее четырех инфекционных заболеваний.

Возможность взаимозаменяемого применения вакцин, представленных в таблице 1, в настоящее время не определена.

Согласно Правилам определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения¹¹ для биологических ЛП, к которым относятся вакцины, взаимозаменяемость устанавливается на основании критериев (характеристик), приведенных в п. 5 документа, а именно: идентичность международных непатентованных или группировочных наименований; эквивалентность лекарственных форм; сопоставимость качественных и количественных характеристик фармацевтических субстанций; идентичность показаний и противопоказаний к применению; эквивалентность показателей фармакокинетики и (или) фармакодинамики; сопоставимость показателей безопасности, эффективности и иммуногенности по результатам исследований терапевтической эквивалентности.

Рассмотрим данные критерии применительно к вакцинам, приведенным в таблице 1. К взаимозаменяемым могут быть отнесены только вакцины, имеющие одинаковое группировочное наименование. К таким вакцинам относятся моновакцины для профилактики туберкулеза, вирусного гепатита В, моновакцины для профилактики полиомиелита, краснухи, комбинированные вакцины для профилактики кори, краснухи, паротита, вакцины для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, а также дифтерии, столбняка, коклюша и вирусного гепатита В и вакцины для профилактики пневмококковых инфекций (табл. 1). Остальные вакцины, приведенные в таблице 1 (комбинированные вакцины с различным сочетанием

антигенов), имеют индивидуальные группировочные наименования и определению взаимозаменяемости не подлежат.

Другие критерии взаимозаменяемости для биологических ЛП на первый взгляд не вызывают вопросов.

В то же время формулировка критерия «сопоставимость качественных и количественных характеристик фармацевтических субстанций»¹² требует дополнительных пояснений. Согласно определению Федерального закона Российской Федерации № 61-ФЗ «фармацевтическая субстанция» представляет собой лекарственное средство в виде одного или нескольких действующих веществ, предназначенное для производства лекарственного препарата¹³. Таким образом, данный критерий регламентирует только сопоставимость действующих веществ взаимозаменяемых вакцин и не учитывает качественный и количественный состав вспомогательных веществ, в том числе адъювантов, стабилизаторов, консервантов. Кроме того, термин «сопоставимость», применяемый для биологических препаратов, предполагает не столько оценку качественного и количественного состава референтного препарата и его биоаналога, сколько проведение сравнительных физико-химических, биологических, фармакологических исследований, позволяющих сделать заключение о высокой степени сходства биологических препаратов и отсутствии клинически значимых различий между ними по показателям качества, эффективности, безопасности¹⁴. Таким образом, формулировка критерия «сопоставимости качественных и количественных характеристик фармацевтических субстанций»¹⁵ недостаточно ясна для оценки взаимозаменяемости вакцин и, возможно, сужает данный критерий до принятого для химических воспроизведенных ЛП критерия «эквивалентность качественного и количественного состава».

Обращают на себя внимание критерии оценки взаимозаменяемости вакцин, связанные с проведением клинических исследований (КИ) (п. 5д, 5е Правил определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения)¹⁶. В связи с тем что исследования фармакокинетики для вакцин не проводятся, а фармакодинамические свойства вакцин невозможно оценить путем прямого сопоставления степени взаимодействия действующего вещества с терапевтической мишенью и длительности этого воздействия, особое значение приобретает критерий «оценки сопоставимости показателей безопасности, эффективности и иммуногенности по результатам исследований терапевтической эквивалентности». Эффективность вакцин определяется в рамках КИ по их иммуногенности с использованием серологических параметров, коррелирующих с защитным иммунитетом к определенной инфекции, например уровней защитных титров специфических антител.

⁹ <http://grls.rosminzdrav.ru/>

¹⁰ Приказ от 21.03.2014 № 125н (ред. № 7 от 20.12.2020) «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям».

¹¹ Правила определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 05.09.2020 № 1360 «О порядке определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения»).

¹² Там же.

¹³ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

¹⁴ Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. EMA; 2015. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-2.pdf

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

¹⁵ Правила определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 05.09.2020 № 1360 «О порядке определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения»).

¹⁶ Там же.

Таблица 1. Вакцины, зарегистрированные в Российской Федерации⁹ и применяемые для профилактики инфекций у детей первого года жизни в рамках национального календаря профилактических прививок¹⁰
Table 1. Vaccines licensed in the Russian Federation⁹ and included in the National Immunisation Schedule for prevention of infections in infants¹⁰

Профилактируемая инфекция Vaccine-preventable infection	Группировочное наименование INN	Торговое наименование ^a Commercial name ^a	
		Моновакцины Monovaccines	Комбинированные вакцины Combination vaccines
Туберкулез Tuberculosis	Вакцина для профилактики туберкулеза Vaccine for the prevention of tuberculosis	БЦЖ (АО «НПО «Микроген», Россия; ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России) BCG (JSC NPO Microgen, Russia; N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Russia) БЦЖ-М (АО «НПО «Микроген», Россия; ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России) BCG-M (JSC NPO Microgen, Russia; N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Russia)	–
	Вакцина для профилактики дифтерии, коклюша и столбняка Vaccine for the prevention of diphtheria, pertussis, and tetanus	–	АКДС-вакцина (АО «НПО «Микроген», Россия; АО «Биомед» им. И. И. Мечникова, Россия) DTP (JSC NPO Microgen, Russia; JSC Mechnikov Biomed, Russia)
Дифтерия, столбняк, коклюш Diphtheria, tetanus, pertussis	Вакцина для профилактики дифтерии, коклюша (бесклеточная) и столбняка Vaccine for the prevention of diphtheria, pertussis (acellular), and tetanus	–	Инфанрикс® Infanrix®
	Вакцина для профилактики дифтерии (с уменьшенным содержанием антигена), коклюша (с уменьшенным содержанием антигена, бесклеточная) и столбняка, адсорбированная Vaccine for the prevention of diphtheria (with reduced antigen content), pertussis (with reduced antigen content, acellular), and tetanus, adsorbed	–	Адасель Adacel®
	Вакцина для профилактики вирусного гепатита В, дифтерии, коклюша и столбняка Vaccine for the prevention of viral hepatitis B, diphtheria, pertussis, and tetanus	–	АКДС-Геп В DTP-Геп В
	Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В адсорбированная жидкая Vaccine for the prevention of pertussis, diphtheria, tetanus, and hepatitis B, adsorbed, liquid	–	Бубо®-Кок Bubo®-Kok
	Вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная), гепатита В, полиомиелита (инактивированная) и инфекций, вызываемых <i>Haemophilus influenzae</i> типа b Vaccine for the prevention of diphtheria, tetanus, pertussis (acellular), hepatitis B, polio (inactivated), and <i>Haemophilus influenzae</i> type b infections	–	Инфанрикс® Гекса Infanrix® Hexa

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Профилактируемая инфекция Vaccine-preventable infection	Группировочное наименование INN	Торговое наименование ^a Commercial name ^a	
		Моновакцины Monovaccines	Комбинированные вакцины Combination vaccines
Дифтерия, столбняк, коклюш Diphtheria, tetanus, pertussis	Вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная), гепатита В и инфекции, вызываемой <i>Haemophilus influenzae</i> типа b Vaccine for the prevention of diphtheria, tetanus, pertussis (acellular), hepatitis B, and <i>Haemophilus influenzae</i> type b infection	–	аАКДС-ГепВ+Hib DTaP-HepB+Hib
	Вакцина для профилактики дифтерии, коклюша, полиомиелита, столбняка и инфекций, вызываемых <i>Haemophilus influenzae</i> типа b Vaccine for the prevention of diphtheria, pertussis, polio, tetanus, and <i>Haemophilus influenzae</i> type b infections	–	Пентаксим® Pentaxim®
Вирусный гепатит В Hepatitis B	Вакцина для профилактики вирусного гепатита В Vaccine for the prevention of hepatitis B	Регевак® В Regevac® B Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая Yeast-recombinant hepatitis B vaccine Энджерикс® В Engerix® B Вакцина гепатита В рекомбинантная (рДНК) Recombinant hepatitis B vaccine (rDNA) Эувакс В Euvox B	–
	Вакцины для профилактики вирусного гепатита В, дифтерии, столбняка Vaccines for the prevention of viral hepatitis B, diphtheria, tetanus	–	Бубо®-М Bubo®-M
	Вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная), гепатита В и инфекции, вызываемой <i>Haemophilus influenzae</i> типа b Vaccine for the prevention of diphtheria, tetanus, pertussis (acellular), hepatitis B, and <i>Haemophilus influenzae</i> type b infection	–	аАКДС-Геп В+Hib DTaP-Hep B+Hib
	Вакцина для профилактики вирусного гепатита В, дифтерии, коклюша и столбняка Vaccine for the prevention of viral hepatitis B, diphtheria, pertussis, and tetanus	–	АКДС-Геп В DTP-Hep B
	Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В адсорбированная жидкая Vaccine for the prevention of pertussis, diphtheria, tetanus, and hepatitis B, adsorbed, liquid	–	Бубо®-Кок Bubo®-Kok

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Профилактируе- мая инфекция Vaccine-prevent- able infection	Группировочное наименование INN	Торговое наименование ^a Commercial name ^a	
		Моновакцины Monovaccines	Комбинированные вакцины Combination vaccines
Вирусный гепатит В Hepatitis B	Вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная), гепатита В, полиомиелита (инактивированная) и инфекций, вызываемых <i>Haemophilus influenzae</i> типа b Vaccine for the prevention of diphtheria, tetanus, pertussis (acellular), hepatitis B, polio (inactivated), and <i>Haemophilus influenzae</i> type b infections	—	Инфанрикс® Гекса Infanrix® Hexa
	Вакцины для профилактики гемофильной инфекции Vaccines for the prevention of <i>Haemophilus influenzae</i>	Вакцина гемофильная тип b конъюгированная <i>Haemophilus influenzae</i> type b vaccine, conjugated	—
Гемофильная инфекция типа b <i>Haemophilus influ- enza</i> type b	Вакцина для профилактики вирусного гепатита В, дифтерии, коклюша, столбняка и инфекций, вызываемых <i>Haemophilus influenzae</i> типа b Vaccine for the prevention of viral hepatitis B, diphtheria, pertussis, tetanus, and <i>Haemophilus influenzae</i> type b infections	—	аАКДС-Геп В+Hib DTaP-Hep B+Hib
	Вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная), гепатита В, полиомиелита (инактивированная) и инфекций, вызываемых <i>Haemophilus influenzae</i> типа b Vaccine for the prevention of diphtheria, tetanus, pertussis (acellular), hepatitis B, polio (inactivated), and <i>Haemophilus influenzae</i> type b infections	—	Инфанрикс® Гекса Infanrix® Hexa
	Вакцина для профилактики дифтерии, коклюша, полиомиелита, столбняка и инфекций, вызываемых <i>Haemophilus influenzae</i> типа b Vaccine for the prevention of diphtheria, pertussis, polio, tetanus, and <i>Haemophilus influenzae</i> type b infections	—	Пентаксим® Pentaxim®
Полиомиелит Polio	Вакцины для профилактики полиомиелита Vaccines for the prevention of polio	Полиорикс® Poliorix® ПОЛИМИЛЕКС® POLIMILEX® МоноВак полио тип 2 MonoVac polio type 2 БиВак полио BiVac polio Вакцина полиомиелитная пероральная 1, 2, 3 типов Oral polio vaccine (type 1, 2, 3)	—
	Вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная), гепатита В, полиомиелита (инактивированная) и инфекций, вызываемых <i>Haemophilus influenzae</i> типа b Vaccine for the prevention of diphtheria, tetanus, pertussis (acellular), hepatitis B, polio (inactivated), and <i>Haemophilus influenzae</i> type b infections	—	Инфанрикс® Гекса Infanrix® Hexa

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Профилактируемая инфекция Vaccine-preventable infection	Группировочное наименование INN	Торговое наименование ^a Commercial name ^a	
		Моновакцины Monovaccines	Комбинированные вакцины Combination vaccines
Поллиомиелит Polio	Вакцина для профилактики дифтерии, коклюша, полиомиелита, столбняка и инфекций, вызываемых <i>Haemophilus influenzae</i> типа b Vaccine for the prevention of diphtheria, pertussis, polio, tetanus, and <i>Haemophilus influenzae</i> type b infections	–	Пентаксим® Pentaxim®
Пневмококковая инфекция Pneumococcal infection	Вакцина для профилактики пневмококковых инфекций Vaccine for the prevention of pneumococcal infections	Синфлорикс® Synflorix® Превенар® 13 Prevenar® 13	–
Корь Measles	Вакцины для профилактики кори Vaccines for the prevention of measles	Вакцина против кори живая аттенуированная Measles vaccine, live, attenuated Вакцина коревая культуральная живая (АО «НПО «Микроген», Россия; ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия) Measles vaccine, cell culture-derived, live (JSC NPO Microgen, Russia; FSRI SRC VB Vector)	–
	Вакцина для профилактики кори и паротита Vaccine for the prevention of measles and mumps	–	Вакцина паротитно-коревая культуральная живая Measles-mumps vaccine, live, cell culture-derived
	Вакцина для профилактики кори, краснухи, паротита Vaccine for the prevention of measles, rubella, mumps	–	Вакцина против кори, паротита и краснухи живая аттенуированная Measles, mumps, and rubella virus vaccine, live, attenuated М-М-Р II® М-М-Р II® Приорикс® Priorix®
Паротит Mumps	Вакцина для профилактики кори, паротита, краснухи и ветряной оспы Vaccine for the prevention of measles, mumps, rubella, and varicella	–	Приорикс-Тетра® Priorix-Tetra®
	Вакцина для профилактики паротита Vaccine for the prevention of mumps	Вакцина паротитная культуральная живая Mumps vaccine, cell culture-derived, live	–
	Вакцина для профилактики кори и паротита Vaccine for the prevention of measles and mumps	–	Вакцина паротитно-коревая культуральная живая Mumps-measles vaccine, live, cell culture-derived

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Профилактируе- мая инфекция Vaccine-prevent- able infection	Группировочное наименование INN	Торговое наименование ^a Commercial name ^a	
		Моновакцины Monovaccines	Комбинированные вакцины Combination vaccines
Паротит Mumps	Вакцина для профилактики кори, краснухи, паротита Vaccine for the prevention of measles, rubella, mumps	—	Вакцина против кори, паротита и краснухи живая аттенуированная Measles, mumps, and rubella virus vaccine, live, attenuated M-M-P II® M-M-R II® Приорикс® Priorix®
	Вакцина для профилактики кори, паротита, краснухи и ветряной оспы Vaccine for the prevention of measles, mumps, rubella, and varicella	—	Приорикс-Тетра® Priorix-Tetra®
	Вакцина для профилактики краснухи Rubella vaccine	Вакцина против краснухи живая аттенуированная (Институт иммунологии Инк, Хорватия; АО «НПО «Микроген», Россия; Серум институт оф Индия Лтд., Индия) Rubella vaccine, live, attenuated (Institute of Immunology Inc., Croatia; JSC NPO Microgen, Russia; Serum Institute of India Pvt. Ltd., India) Вакцина против краснухи культуральная живая аттенуированная (АО «НПО «Микроген», Россия) Rubella vaccine, cell culture-derived, live, attenuated (JSC NPO Microgen, Russia)	—
Краснуха Rubella	Вакцина для профилактики кори и паротита Vaccine for the prevention of measles and mumps	—	Вакцина паротитно-коревая культуральная живая Mumps-measles vaccine, live, culture-derived
	Вакцина для профилактики кори, краснухи, паротита Vaccine for the prevention of measles, rubella, mumps	—	Вакцина против кори, паротита и краснухи живая аттенуированная Measles, mumps, and rubella virus vaccine live attenuated M-M-P II® M-M-R II® Приорикс® Priorix®
	Вакцина для профилактики кори, паротита, краснухи и ветряной оспы Vaccine for the prevention of measles, mumps, rubella, and varicella	—	Приорикс-Тетра® Priorix-Tetra®

Примечание. Производители препаратов указаны только в том случае, если их несколько. «—» обозначает отсутствие зарегистрированных вакцин, соответствующих информации, указанной в заглавии строки или столбца таблицы.

^a Представлены сокращенные торговые наименования вакцин.

Note. The manufacturer is specified only if there are several manufacturers. — means that there are no licensed vaccines matching the information presented in the table row or column. INN - International Nonproprietary Names.

^a The table gives the vaccines' short trade names.

Однако приемлемые критерии для оценки сопоставимости показателей эффективности (иммуногенности) вакцин в Правилах определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения (п. 5е) не определены¹⁷. Для других биологических препаратов, например для биоаналогов, результаты оцениваемых показателей эффективности в КИ должны укладываться в 80–125% диапазон значений показателей для референтного препарата. Для проведения сравнительных КИ не рекомендуется использовать дизайн «неменьшей» (non-inferiority) эффективности, поскольку при отсутствии верхней границы измеряемого показателя эффективности получение высоких значений для исследуемого препарата может потребовать дополнительного подтверждения их клинической незначимости и безопасности¹⁸.

В сравнительных КИ иммуногенности для вакцин применяются различные дизайны исследований¹⁹. Измеряемыми параметрами являются титры специфических антител. Часто для подтверждения иммуногенности вакцины используют показатель сероконверсии. Изменение титра специфических антител более чем в 4 раза по сравнению с их уровнем до иммунизации принимается в качестве доказательства эффективного ответа на вакцинацию.

При дополнении зарегистрированной вакцины новым антигеном проводят сравнительные КИ, в которых сопоставляют уровни иммунного ответа на новый и старый составы одной и той же вакцины и используют статистические модели оценки «неменьшей» (non-inferiority) эффективности для всех антигенов старого состава и «превосходящей» (superiority) эффективности для нового состава антигенов. Такие КИ проводились при разработке пневмококковых вакцин Prevnar 20²⁰ и V114²¹. В некоторых случаях для подтверждения иммуногенности нового антигена в составе уже зарегистрированной вакцины в качестве контроля используют соответствующую моновакцину. Например, при разработке нового состава вакцины Infanrix-IPV в качестве препаратов сравнения применяли зарегистрированные вакцины Infanrix® (GSK Biologicals) и IPOL® (Aventis Pasteur's)²².

Аналогичный подход к оценке иммуногенности был использован при разработке новой пневмококковой вакцины NBP606, полностью воспроизводящей антигенный состав вакцины Превенар® 13²³. Конечными точками в КИ по оценке эффективности вакцины NBP606 были доля участников, у которых концентрация специфических антител к каждому из 13 серотипов пневмококка достигала значений не менее 0,35 мкг/мл, а также соотношение средних геометрических титров специфических иммуноглобулинов и нейтрализующих антител — не менее 0,5 в сравнении с вакциной Превенар® 13. Во всех приведенных примерах сопоставление эффектив-

ности и безопасности вакцин проводили последовательно для всех возрастных групп, указанных в показаниях к применению, с учетом различных схем вакцинации и сроков ревакцинации.

Объем КИ, который является достаточным для заключения о сопоставимой безопасности, эффективности, иммуногенности и терапевтической эквивалентности вакцин в Правилах определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения (п. 5е)²⁴ не определен.

Сравнение вакцин по уровню специфических иммуноглобулинов целесообразно только при наличии данных о защитных уровнях гуморального ответа [3]. Однако для некоторых инфекций (например, коклюш) до сих пор неизвестны серологические маркеры, позволяющие прогнозировать долгосрочную профилактическую эффективность вакцины по результатам оценки ее иммуногенности²⁵ [4].

При сопоставлении показателей иммуногенности важно оценить не только частоту достижения защитного уровня серологического ответа у вакцинированных, который не всегда коррелирует с профилактической эффективностью и не может гарантировать идентичность длительности и напряженности иммунного ответа [3, 5]. Необходимо оценить долю привитых, у которых выявлено достижение титров антител более высоких, чем защитный, на все или несколько антигенов, или, наоборот, не ответивших на введение вакцины, поскольку вариабельность иммунного ответа среди вакцинированных, которая зависит от свойств вакцины, индивидуальных особенностей иммунной системы, исходного титра антител у каждого привитого, может оказать существенное влияние на конечный результат и интерпретацию данных о сопоставимой иммуногенности сравниваемых вакцин [3, 5].

Следует также обратить внимание, что для зарегистрированных вакцин все необходимые КИ эффективности и безопасности уже завершены и информация о сравнительных исследованиях иммуногенности и безопасности с аналогичными вакцинами может отсутствовать, что осложнит процедуру оценки их взаимозаменяемости в соответствии с указанными критериями. В соответствии с утвержденными правилами обращения ЛП в рамках определения взаимозаменяемости, при отсутствии в регистрационном досье препарата результатов исследования, подтверждающих его «биоэквивалентность или терапевтическую эквивалентность в отношении референтного препарата, такие КИ должны быть проведены в срок, не превышающий 3 лет»²⁶. Возможность рассмотрения данных пост-регистрационных исследований, подтверждающих сопоставимость профилактической эффективности и безопасности вакцин при определении их взаимозаменяемости, в существующих нормативных документах не определена.

¹⁷ Там же.

¹⁸ Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. EMA; 2015. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-2.pdf

¹⁹ WHO expert committee on biological standardization, sixty-seventh report. WHO technical reports series No. 1004. WHO; 2017.

²⁰ <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=&cond=Prevnar+20&term=&cntry=&state=&city=&dist=>

²¹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=&cond=V114&term=&cntry=&state=&city=&dist=>

²² <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00263692?cond=Infanrix-IPV&draw=3&rank=15>

²³ <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=&cond=NBP606&term=&cntry=&state=&city=&dist=>

²⁴ Правила определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 05.09.2020 № 1360 «О порядке определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения»).

²⁵ WHO recommendations for routine immunization — summary tables. WHO; 2020. https://www.who.int/immunization/policy/immunization_tables/en/

²⁶ Постановление Правительства Российской Федерации от 01.10.2020 № 1583 «Об утверждении Правил обращения воспроизведенных лекарственных препаратов, биоаналоговых (биоподобных) лекарственных препаратов (биоаналогов) до окончания срока, установленного для проведения исследований их биоэквивалентности или терапевтической эквивалентности либо внесения изменений в инструкцию по медицинскому применению в рамках определения взаимозаменяемости».

Необходимое для экспертного заключения о взаимозаменяемости вакцин соответствие показаний и противопоказаний к применению, указанных в инструкции (п. 5г Правил определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения)²⁷, может осложняться для вакцин с несколькими одинаково эффективными схемами иммунизации. Приведение в соответствие показаний и противопоказаний для взаимозаменяемых вакцин не может не затрагивать других фармацевтических разделов инструкций по медицинскому применению, таких как «Фармакологические свойства», «Особые указания», «Взаимодействие с другими лекарственными средствами», содержащих информацию, которая не должна различаться для взаимозаменяемых вакцин. Кроме того, следует учитывать, что в инструкциях по применению многих вакцин указывается на необходимость применения одной и той же вакцины в рамках одного курса вакцинации, что противоречит принципам взаимозаменяемости ЛП.

Таким образом, формулировки критериев взаимозаменяемости вакцин, указанные в Правилах определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения²⁸, нуждаются в уточнении или дополнении для определения объема исследований, требуемых для оценки сопоставимости фармацевтических субстанций вакцин и при оценке сопоставимой эффективности, безопасности и иммуногенности с учетом схем вакцинации для разных возрастных групп, а также при приведении в соответствие инструкций по медицинскому применению взаимозаменяемых вакцин.

Международный опыт в определении взаимозаменяемости вакцин

Концепция взаимозаменяемости вакцин, как правило, является частью руководств и нормативных документов по вакцинопрофилактике и имеет свои особенности в разных странах. Так, в руководстве по вакцинопрофилактике США, в котором взаимозаменяемость вакцин описана очень подробно²⁹, указывается, что лицензирование или регистрация вакцин разных производителей с одинаковыми показаниями к применению не обязательно означает их взаимозаменяемость, поскольку вакцины, обеспечивающие защиту от одних и тех же инфекций, изготовленные разными производителями, могут различаться по числу специфических антигенных компонентов, видам адъювантов и конъюгирующих агентов, что может приводить к различиям в иммунных ответах на вакцинацию. Поэтому взаимозаменяемость вакцин разных производителей должна быть подтверждена в ходе КИ сопоставимостью показателей защитного иммунитета в соответствии с известными данными о специфических серологических маркерах иммунного ответа на данную инфекцию. Для заболеваний с неиз-

вестными маркерами иммунного ответа необходимо получить данные о сравнительной профилактической эффективности вакцин, то есть влиянии вакцинации на заболеваемость. Такие исследования могут быть проведены как в предрегистрационный, так и в пострегистрационный периоды³⁰.

В руководстве указывается, что вне зависимости от статуса взаимозаменяемости следует применять одну и ту же вакцину для завершения полного курса вакцинации. Только в тех случаях, когда это невозможно в связи с отсутствием ранее введенной вакцины, или если сведения о наименовании введенной ранее вакцины отсутствуют, необходимо провести вакцинацию любой подходящей зарегистрированной вакциной в соответствии с рекомендованным графиком вакцинации и режимом дозирования, указанным в инструкции по медицинскому применению.

В руководстве по вакцинопрофилактике США в качестве базового принципа взаимозаменяемости для вакцин принята взаимозаменяемость антигенов, при этом разграничены правила взаимозаменяемости для следующих групп вакцин³¹:

- моновакцин разных производителей;
- комбинированных вакцин, антигены которых произведены тем же производителем, который ранее зарегистрировал моновакцины с теми же антигенами;
- комбинированных вакцин, выпускаемых разными производителями.

Для первой группы — моновакцин, произведенных различными компаниями-производителями, — приоритетным фактором является степень изученности антигена и наличие сведений о серологических маркерах формирования длительного иммунитета и защитных титрах.

Для таких хорошо изученных антигенов, как капсульный полисахарид *Haemophilus influenzae* типа b (Hib-антиген), поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и некоторых других, по мнению Консультативного комитета по проблемам вакцинации США (Advisory Committee on Immunization Practices, ACIP)³², собрано достаточно данных о формировании гуморального ответа, позволяющих оценить их взаимозаменяемость³³ [6–9]. Следует обратить внимание, что речь идет о конкретных зарегистрированных в США вакцинах, содержащих идентичные и хорошо изученные антигены (капсульный Hib-антиген; HBsAg серотипа adw и т. д.), с известными серологическими маркерами поствакцинального защитного иммунитета. Согласно выводам экспертов ACIP все зарегистрированные в США вакцины против гемофильной инфекции (ActHIB, PedvaxHIB, Hiberix), гепатита В (Recombivax HB, Engerix-B)³⁴, гепатита А (Havrix, VAQTA)³⁵, ротавирусной инфекции (Rotarix, RotaTeq)³⁶, менингококковой инфекции (Menveo, Menactra, MenQuadfi)³⁷ взаимозаменяемы, что подтверждают имеющиеся данные КИ.

²⁷ Правила определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 05.09.2020 № 1360 «О порядке определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения»).

²⁸ Там же.

²⁹ Kroger A, Bahta L, Hunter P. General best practice guidelines for immunization. Best practices guidance of the advisory committee on immunization practices (ACIP). www.cdc.gov/vaccines/hcp/acip-recs/general-recs/downloads/general-recs.pdf

³⁰ Там же.

³¹ Там же.

³² <https://www.cdc.gov/vaccines/acip/index.html>

³³ Kroger A, Bahta L, Hunter P. General best practice guidelines for immunization. Best practices guidance of the advisory committee on immunization practices (ACIP). www.cdc.gov/vaccines/hcp/acip-recs/general-recs/downloads/general-recs.pdf

³⁴ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00414050?cond=NCT00414050&draw=2&rank=1>

³⁵ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03654664?cond=NCT03654664&draw=2&rank=1>

³⁶ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01266850?cond=RotaTeq+and+ROTARIX&draw=2&rank=1>

³⁷ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02842866?cond=NCT02842866&draw=2&rank=1>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02752906?cond=NCT02752906&draw=2&rank=1>

В качестве примера можно привести вакцины для профилактики гемофильной инфекции, зарегистрированные в США, содержащие Hib-антиген в виде конъюгатов со столбнячным анатоксином (ActHib, Hiberix, Pentacel) или поверхностным антигеном менингококка (PedvaxHib). Схемы введения при первичной иммунизации у вакцин с разными конъюгатами различаются: ActHib, Hiberix, Pentacel вводятся в четырех дозах в 2, 4, 6, 12–15 месяцев; PedvaxHib вводят в трех дозах в 2, 4, 12–15 месяцев. Поскольку все перечисленные вакцины взаимозаменяемы, возможно их перекрестное применение в течение курса первичной вакцинации. Курс введения в этом случае должен состоять из четырех доз. Кроме того, любая моновалентная или комбинированная вакцина, содержащая Hib-антиген, является приемлемой для бустерной вакцинации, если при проведении первичного курса вакцинации применялась только одна вакцина³⁸. Порядок взаимозаменяемого применения отдельных вакцин дополнительно приводится в примечаниях к графику вакцинации для каждой возрастной группы³⁹.

Для группы комбинированных вакцин, антигены которых произведены тем же производителем, который ранее производил моновакцины с теми же антигенами⁴⁰, — все необходимые исследования иммуногенности и безопасности проводятся до регистрации комбинированной вакцины. Препаратами сравнения в этих исследованиях служат зарегистрированные моновакцины, являющиеся компонентами комбинированного препарата. Поэтому, согласно правилам взаимозаменяемости, принятым в США, все зарегистрированные комбинированные вакцины обычно могут применяться взаимозаменяемо с моновакцинами или другими комбинированными вакцинами с аналогичным составом антигенов при условии, что эти антигены произведены одним производителем. В качестве примера можно привести вакцины, содержащие дифтерийный, столбнячный, бесклеточный коклюшный (DTaP), полиомиелитный (IPV), гепатитный (HepB), гемофильный (Hib) антигены в различном сочетании (DTaP-IPV/Hib, DTaP-HepB-IPV)⁴¹. К таким вакцинам, находящимся в обращении в США, относятся вакцины Infanrix (DTaP), Kinrix (DTaP-IPV), Pediatrix (DTaP-HepB-IPV), компании Glaxo-SmithKline и вакцины Daptacel (DTaP), Pentacel (DTaP-IPV/Hib), Quadracel (DTaP-IPV), произведенные Sanofi Pasteur, Inc.

Для группы комбинированных вакцин, выпускаемых разными производителями, регуляторными органами США устанавливаются наиболее жесткие правила подтверждения взаимозаменяемости. Для вакцин этой группы необходимо подтверждение в ходе КИ сопоставимости показателей специфических серологических маркеров протективного иммунного ответа или проведение КИ сравнительной профилактической эффективности, рассчитанной по показателю заболеваемости в популяциях, привитых той или другой вакциной, в случае если серологические маркеры протективного ответа на вакцинацию неизвестны (например, коклюшная вакцина).

В одном из КИ [10] трем группам детей в возрасте 2, 4 и 6 месяцев вводили по 3 дозы вакцины для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша по одной из схем: 3 дозы вакцины Tripedia (Sanofi Pasteur, Inc.); 2 дозы вакцины Tripedia, а затем 1 дозу вакцины Infanrix (GlaxoSmithKline); 1 дозу вакцины Tripedia и затем 2 дозы вакцины Infanrix. Определение иммуногенности в отношении каждого из антигенов проводили через месяц после введения последней, третьей дозы. У детей всех групп выявлены значительные уровни антител к дифтерийному, столбнячному и коклюшным антигенам. Расчет соотношений средних геометрических титров антител показал, что у детей, получивших разные вакцины во время вакцинации, обнаружено достижение более высоких титров антител к дифтерийному антигену и филаментозному гемагглютиниру коклюша по сравнению с первой группой детей, иммунизированных только вакциной Tripedia. Однако выявленные различия не были статистически значимыми и составляли не более 10%. Согласно полученным результатам все три схемы показали сопоставимую иммуногенность [10]. Однако из-за отсутствия четкого серологического маркера протективного ответа на коклюшную инфекцию результаты данного исследования не позволяют прогнозировать результаты других смешанных схем с применением вакцин разных производителей. Таким образом, выводы о сопоставимости иммунного ответа к коклюшным антигенам разного происхождения невозможно экстраполировать на профилактическую эффективность разных вакцин в отношении коклюшной инфекции. В связи с этим в рамках вакцинации против дифтерии, столбняка и коклюша рекомендуется применять одну и ту же вакцину⁴².

Концепция взаимозаменяемости вакцин, зарегистрированных в США, основана на принципах, связанных со степенью изученности антигенов, входящих в состав вакцины, наличием серологических маркеров защитного иммунитета и клинических данных, подтверждающих сопоставимую иммуногенность на предрегистрационном этапе и профилактическую эффективность взаимозаменяемых вакцин на пострегистрационном этапе.

Следует отметить, что общей рекомендацией по взаимозаменяемости вакцин в разных странах является соблюдение сроков иммунизации вне зависимости от статуса взаимозаменяемости или доступности вакцины определенного производителя⁴³. На практике при отсутствии информации о введенной ранее вакцине курс иммунизации или ревакцинации должен быть проведен любой доступной вакциной в соответствии с дозой и схемой, указанной в инструкции по ее применению.

Отсутствие информации о взаимозаменяемости не является препятствием к проведению пострегистрационных КИ по оценке эффективности и безопасности комбинированных вакцин с аналогичными показаниями к применению. Так, в опу-

³⁸ Kroger A, Bahta L, Hunter P. General best practice guidelines for immunization. Best practices guidance of the advisory committee on immunization practices (ACIP). www.cdc.gov/vaccines/hcp/acip-recs/general-recs/downloads/general-recs.pdf

³⁹ Там же.

⁴⁰ Там же.

⁴¹ Там же.

⁴² Там же.

⁴³ Kroger A, Bahta L, Hunter P. General best practice guidelines for immunization. Best practices guidance of the advisory committee on immunization practices (ACIP). www.cdc.gov/vaccines/hcp/acip-recs/general-recs/downloads/general-recs.pdf

<https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/healthy-living/canadian-immunization-guide-part-1-key-immunization-information/page-7-principles-vaccine-interchangeability.html>

<https://immunisationhandbook.health.gov.au/vaccine-preventable-diseases>

Ramsay M, ed. Immunisation against infectious disease. London: Public Health England; 2018. <https://www.gov.uk/government/collections/immunisation-against-infectious-disease-the-green-book#the-green-book>

бликованных в 2018 г. материалах представлены результаты экспертной оценки эффективности контроля заболеваемости дифтерией, столбняком, коклюшем, гепатитом В, полиомиелитом и гемофильной инфекцией в Италии после введения в обращение трех шестивалентных комбинированных вакцин: *Infanrix Hexa* (GlaxoSmithKline), *Hexyon* (Sanofi Pasteur, Inc.) и *Vaxelis* (Sanofi & Merck&Co.) [11]. Шестивалентные комбинированные вакцины применяются в Италии и других европейских странах уже более 15 лет и являются наиболее часто используемыми вакцинами для иммунизации детей первого года жизни. Несмотря на полученные при регистрации данные о сопоставимой иммуногенности в соответствии с установленными для каждого антигена серологическими маркерами защитного иммунного ответа, различия в составе вакцин, технологии производства антигенов и в особенности в методах их очистки и детоксикации бактериальных токсинов, был проведен пострегистрационный анализ данных о напряженности иммунитета и уровне заболеваемости в сравнении с предыдущим периодом до применения шестивалентных комбинированных вакцин [11]. Были проведены соответствующие КИ, в том числе воспроизводящие схему вакцинации в каждой возрастной группе с совместным введением других вакцин национального календаря (вакцин для профилактики пневмококковой и ротавирусной инфекций). Несмотря на существенные различия в составе, три вакцины показали сопоставимый иммунный ответ. Более того, наличие защитных титров антител после вакцинации каждой из исследуемых вакцин было подтверждено на протяжении всего периода до проведения бустерной иммунизации в соответствии с графиком прививок, гарантируя защиту от риска передачи инфекции у подростков и взрослых. Представленные результаты пострегистрационного эпидемиологического надзора за распространением профилактируемых инфекций в Италии подтвердили эффективность применения трех разных шестивалентных вакцин в снижении заболеваемости коклюшем и гемофильной инфекцией [11]. Поскольку вакцинация детей до одного года является сложным процессом с очень плотным графиком иммунизации, информация об эффективности и безопасности применения комбинированных вакцин разных производителей чрезвычайно важна и необходима в тех случаях, когда ранее введенная вакцина неизвестна или недоступна.

Таким образом, в связи с появлением новых вакцин и обновлением данных о пострегистрационном применении вакцин с одинаковыми показаниями к применению концепция взаимозаменяемости может пересматриваться, что особенно важно в случае необходимости завершения графика вакцинации для детей с неизвестным анамнезом или в случае отсутствия необходимой вакцины [12, 13].

С точки зрения пострегистрационной оценки взаимозаменяемости вакцин разных производителей интересны выводы, приведенные в обзоре, посвященном взаимозаменяемости конъюгированных вакцин для профилактики пневмококковой инфекции (Превенар® 13 и Синфлорикс®) [14]. Обе вакцины содержат полисахариды *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированные с рекомбинантным фрагментом дифтерийного токсина CRM197 (Превенар® 13) или с D-полисахаридом нетипируемой *Haemophilus influenzae*, столбнячным и дифтерийным анатоксинами (Синфлорикс®). Вакцины имеют отличия по серотипам *Streptococcus pneumoniae*, включенным

в состав. Схемы первичной и бустерной вакцинации у детей до одного года для обеих вакцин совпадают. До настоящего времени сравнительных исследований эффективности и безопасности Превенар® 13 и Синфлорикс® не проводилось. Согласно инструкциям по медицинскому применению обеих вакцин курс вакцинации должен быть начат и закончен одной и той же вакциной. Несмотря на это в ряде стран в национальные программы вакцинации включены обе вакцины, и часть детей завершает курс вакцинации не той вакциной, которой проводился первичный курс [14]. Проведен метаанализ двух рандомизированных и двух нерандомизированных КИ по оценке эффективности вакцинации детей первого года жизни, включавшей: первичный курс иммунизации вакциной Превенар® 13 с последующей бустерной дозой Синфлорикс® или Превенар® 13; первичный курс иммунизации вакциной Синфлорикс® или Превенар® 13 с ревакцинацией только вакциной Превенар® 13; первичный курс, состоящий из одной дозы вакцины Синфлорикс® и одной дозы Превенар® 13 в сравнении с полным курсом вакцинации и ревакцинации вакциной Синфлорикс®. Обобщение результатов четырех предрегистрационных и двух пострегистрационных КИ об иммуногенности, безопасности, реактогенности и профилактической эффективности вакцинации при смешанном применении вакцин Превенар® 13 и Синфлорикс® продемонстрировало достижение целевых значений средних геометрических титров специфических и нейтрализующих антител независимо от схемы вакцинации и сопоставимую профилактическую эффективность в предотвращении инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae* 13 серотипов. Авторы проведенного метаанализа подчеркивают, что для корректной оценки применимости схем перекрестного применения вакцин Превенар® 13 и Синфлорикс® необходимы дополнительные исследования, которые позволят статистически достоверно оценить влияние взаимозаменяемого применения двух вакцин на конечную эффективность вакцинации — общее число заболеваний, вызванных пневмококковой инфекцией.

Следует отметить, что возможным аргументом в пользу замены вакцин и, в частности, вакцин Превенар® 13 на Синфлорикс® может быть и такой фактор, как существенно более высокая стоимость вакцины Превенар® 13 при отсутствии убедительных доказательств, что она эффективнее предотвращает пневмококковые заболевания⁴⁴.

Таким образом, основываясь на представленных данных по комбинированным вакцинам для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В, полиомиелита и гемофильной инфекции, можно сделать вывод о том, что вклад результатов пострегистрационных исследований имеет важное значение для оценки взаимозаменяемости вакцин.

Проблемы в определении взаимозаменяемости для вакцин национального календаря профилактических прививок Российской Федерации

Определение взаимозаменяемости вакцин национально-го календаря профилактических прививок распространяется на вакцины, имеющие идентичные группировочные наименования⁴⁵.

К таким вакцинам из приведенных в таблице 1 относятся вакцины для профилактики туберкулеза БЦЖ и БЦЖ-М раз-

⁴⁴ Pneumococcal conjugate vaccines. <https://www.quebec.ca/en/health/advice-and-prevention/vaccination/pneumococcal-conjugate-vaccine>

⁴⁵ Правила определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения (п. 5а) (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 05.09.2020 № 1360 «О порядке определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения»).

ных производителей. Эти вакцины полностью удовлетворяют критериям взаимозаменяемости по сопоставимости фармацевтических субстанций, показаниям и противопоказаниям к применению, эффективности и безопасности, поскольку производятся по единой технологии с использованием одного и того же штамма *Mycobacterium bovis* BCG-I (Russia) и отвечают одним и тем же требованиям к качеству [15]. В данном случае необходимость в проведении КИ для оценки сопоставимости явно отсутствует. В то же время, согласно критериям оценки взаимозаменяемости, предоставление материалов сопоставимости эффективности и безопасности в рамках КИ является обязательным⁴⁶. Кроме того, процедура оценки взаимозаменяемости предполагает наличие референтной вакцины, то есть вакцины, которая зарегистрирована впервые на основании собственных результатов доклинических и клинических исследований⁴⁷. Выбор референтной вакцины БЦЖ и БЦЖ-М в силу указанных выше причин не представляется возможным.

В национальном календаре профилактических прививок Российской Федерации (табл. 1) представлены пять вакцин, содержащих рекомбинантный поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), полученный согласно информации инструкций по медицинскому применению в различных штаммах-производителях, которые имеют идентичное группировочное наименование «вакцины для профилактики вирусного гепатита В». Согласно экспертным оценкам российских специалистов, моновакцины для профилактики гепатита В взаимозаменяемы, поскольку показывают идентичную напряженность иммунитета в пострегистрационных наблюдениях [1, 2]. В то же время для определения взаимозаменяемости моновакцин для профилактики гепатита В необходимо учитывать наличие структурных различий антигенов в сравниваемых вакцинах и сопоставимость качественного состава фармацевтических субстанций.

Опубликованы данные исследований [16–18], свидетельствующие о том, что при оценке взаимозаменяемости вакцин для профилактики гепатита В следует учитывать серотип HBsAg в составе вакцины. В формировании иммунного ответа на введение вакцины доминирующая роль принадлежит детерминанте а HBsAg, присутствующей во всех его серотипах [16]. Имеются данные [17], полученные *in vitro* и *in vivo*, о том, что антитела к иммунодоминантной детерминанте а HBsAg обеспечивают защиту и в отношении других субдоминантных детерминант (d/y и w/r).

В работе В. П. Чуланова с соавт. [17] приведены сведения о том, что различия в структуре антигенов вакцин против гепатита В могут иметь существенное значение для профилактической эффективности данных вакцин. Представлены данные о неравноценности иммунного ответа на разные серотипы/субтипы HBsAg как по кинетике выработки антител, так и по их специфичности. Однако некоторые аспекты вакцинации против гепатита В требуют дальнейшего изучения [17]. В частности, вопрос о роли влияния скорости формирования раннего иммунного ответа и перекрестного иммунного ответа для эффективности иммунопрофилактики. Актуальной является проблема установления вероятности заражения гепатитом В на фоне вакцинации антигеном гетерологического штамма, в особенности при посещении

географических регионов с преимущественной циркуляцией штаммов вируса гепатита В других серотипов. Известны данные о редких случаях заболеваний у вакцинированных субъектов, в частности, в 2008 г. у доноров крови выявлено девять случаев инфицирования гепатитом В [16]. При этом шесть из девяти доноров были иммунизированы вакцинами против гепатита В, содержащими адв серотип HBsAg (например, Engerix-B), и четыре из них имели уровни титра антител к HBsAg более 10 мМЕ/мл [16]. Выявленные случаи инфицирования были вызваны вирусами других серотипов, протекали бессимптомно, без терапевтического вмешательства, что указывает на то, что вакцинация гетерологичным антигеном все-таки предотвращала развитие клинического заболевания. Таким образом, применяемые в настоящее время вакцины против гепатита В достаточно эффективны в отношении всех известных генотипов вируса гепатита В. Однако выявленные случаи заражения гетерогенными штаммами заслуживают внимания, поскольку перекрестное инфицирование с бессимптомным протеканием заболевания у вакцинированных доноров может представлять опасность для людей с иммуносупрессией или хроническими заболеваниями печени, подверженных риску молниеносного развития вирусной инфекции [17].

Значимость фактора различий в серотипах антигенов для профилактики гепатита В обсуждается и в опубликованных результатах КИ по оценке эффективности вакцины Euvax B у пациентов с ВИЧ-инфекцией [18]. Исследование, проведенное в странах Латинской Америки, показало, что у взрослых пациентов с ВИЧ-инфекцией выработка специфических антител на вакцинацию Euvax B наблюдалась в 80%.

Отсутствие иммунного ответа на вакцинацию у 20% ВИЧ-инфицированных пациентов после завершения полного курса вакцинации авторы связывают с двумя факторами: серотипом антигена в вакцине и генетическими особенностями населения Латинской Америки. По мнению авторов, преобладание среди циркулирующих в странах Латинской Америки штаммов вируса генотипов H, A, D, отличающихся по серотипу от антигена, входящего в состав вакцины, позволяет предположить, что пациенты, не ответившие на вакцинацию выработкой антител, были ранее инфицированы штаммом другого серотипа [18].

Следует отметить, что информация о точном антигенном составе вакцин против вируса гепатита В с указанием серотипа HBsAg приведена в инструкциях по медицинскому применению только для трех вакцин из пяти. Это вакцины Регевак®, производства АО «Биннофарм» (серотип ауw), Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая жидкая производства ЗАО НПК «Комбиотех» (серотип ау и/или ад), Энджерикс® В производства ЗАО «ГлаксосмитКляйн Трейдинг» (серотип адw).

Таким образом, при оценке взаимозаменяемости зарегистрированных в Российской Федерации моновакцин против вирусного гепатита В следует внимательно относиться к вопросам генетического полиморфизма штаммов вируса при оценке сопоставимости вакцин с разными серотипами HBsAg с учетом современных научных данных о вероятной клинической значимости таких различий. Информацию о серотипе HBsAg следует учитывать при выборе референтной вакцины. Кроме того, в рамках приведения в соответствие инструкций

⁴⁶ Постановление Правительства Российской Федерации от 01.10.2020 № 1583 «Об утверждении Правил обращения воспроизведенных лекарственных препаратов, биоаналоговых (биоподобных) лекарственных препаратов (биоаналогов) до окончания срока, установленного для проведения исследований их биоэквивалентности или терапевтической эквивалентности либо внесения изменений в инструкцию по медицинскому применению в рамках определения взаимозаменяемости».

⁴⁷ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

по применению взаимозаменяемого и референтного препаратов должен быть указан точный антигенный состав обеих вакцин.

Вакцины с группировочным наименованием «вакцина для профилактики дифтерии, коклюша и столбняка» — АКДС производства АО «НПО «Микроген» (Россия) и АО «Биомед» им. И.И. Мечникова (Россия) имеют эквивалентный состав хорошо изученных антигенов и многолетнюю практику применения. В связи с тем что, согласно критериям оценки взаимозаменяемости, предоставление материалов сопоставимой эффективности и безопасности в рамках КИ является обязательным⁴⁸, решением вопроса могло бы быть рассмотрение материалов пострегистрационного применения вакцин АКДС обоих производителей в виде отчетов о мониторинге эффективности и безопасности или иных документов регистрационного досье. Однако так же, как и для вакцин для профилактики туберкулеза, выбор референтной вакцины в данном случае не представляется возможным.

Вакцины Бубо®-Кок производства ЗАО НПК «Комбиотех» (Россия) и АКДС-Геп В, АО «НПО «Микроген» (Россия), имеют общее группировочное наименование и содержат антигены возбудителей дифтерии, коклюша, столбняка и вирусного гепатита В в эквивалентных концентрациях. В соответствии с определением Федерального закона Российской Федерации № 61-ФЗ⁴⁹ референтной вакциной в данной группе будет являться вакцина Бубо®-Кок. При оценке сопоставимости эффективности, безопасности и иммуногенности в рамках сравнительных КИ следует принимать во внимание, что для коклюшного антигена не установлены уровни иммунного ответа, обеспечивающие протективные свойства вакцины. Для вакцин, содержащих бесклеточный коклюшный компонент, от разных производителей сравнительные данные иммуногенности не являются достаточными для подтверждения взаимозаменяемости.

С группировочным наименованием «вакцина для профилактики полиомиелита» в России зарегистрированы две инактивированные полиомиелитные вакцины в виде суспензий для внутримышечного и подкожного введения, содержащие антигены вируса полиомиелита 1, 2, 3 типов (Полиорикс®, ЗАО «ГлаксоСмитКляйн Трейдинг», Россия; ПОЛИМИЛЕКС®, ООО «Нанолек», Россия), а также три оральных полиомиелитных вакцины, содержащих ослабленный живой вирус полиомиелита одного или нескольких типов: МоноВак полио тип 2 (Вакцина полиомиелитная пероральная, моновалентная, живая аттенуированная 2 типа); БиВак полио (Вакцина полиомиелитная пероральная, двухвалентная, живая аттенуированная 1, 3 типов) и Вакцина полиомиелитная пероральная 1, 2, 3 типов ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН», Россия (табл. 1). Оральные и инактивированные вакцины для профилактики полиомиелита имеют разный состав, лекарственную форму, противопоказания. Очевидно, в группе вакцин для профилактики полиомиелита будет несколько референтных вакцин и соответствующих им взаимозаменяемых вакцин, что в послед-

ующем, возможно, осложнит назначение вакцин для профилактики полиомиелита в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации № 1357⁵⁰.

Для профилактики кори, краснухи, паротита зарегистрирован ряд моно- и комбинированных вакцин различных производителей. Следует отметить, что для некоторых комбинированных вакцин референтными являются ранее зарегистрированные моновакцины того же производителя (например, вакцины производства АО «НПО «Микроген», Россия и производства «Серум Институт оф Индия Лтд», Индия). Однако утвержденный в России порядок оценки взаимозаменяемости не позволяет устанавливать взаимозаменяемость вакцин с разными группировочными наименованиями, к которым относятся моновакцины и комбинированные вакцины.

Вакцины для профилактики пневмококковых инфекций представлены в России двумя вакцинами: Синфлорикс® (ЗАО «ГлаксоСмитКляйн Трейдинг», Россия) и Превенар® 13 («Пфайзер Инк», США), которые имеют идентичное группировочное наименование, но по составу фармацевтических субстанций не могут быть взаимозаменяемыми.

Остальные вакцины, применяемые в рамках национального календаря профилактических прививок (табл. 1), имеют разные группировочные наименования и не соответствуют первому критерию взаимозаменяемости. Такие вакцины, по всей вероятности, будут в перспективе референтными для новых вакцин.

Таким образом, среди вакцин, применяемых в рамках национального календаря профилактических прививок, не все вакцины подлежат оценке взаимозаменяемости.

Заключение

Анализ применимости к вакцинам национального календаря профилактических прививок установленных законодательно критериев определения взаимозаменяемости выявил необходимость их уточнения.

Сложным для понимания и применения при оценке взаимозаменяемости вакцин является критерий «сопоставимость качественных и количественных характеристик фармацевтических субстанций», который ограничивает определение сопоставимости определением состава действующих веществ сравниваемых вакцин. В критериях оценки взаимозаменяемости вакцин не отражены требования к объему исследований иммуногенности, не учтена необходимость проведения сравнительных КИ в различных возрастных группах. Не установлена возможность применения в качестве доказательной базы сопоставимой эффективности для зарегистрированных вакцин результатов пострегистрационных исследований. Отсутствуют механизмы оценки взаимозаменяемости вакцин в тех случаях, когда референтными для комбинированных вакцин являются моновакцины того же производителя.

Оценка взаимозаменяемости зарегистрированных вакцин в соответствии с установленными критериями представляет

⁴⁸ Постановление Правительства Российской Федерации от 01.10.2020 № 1583 «Об утверждении Правил обращения воспроизведенных лекарственных препаратов, биоаналоговых (биоподобных) лекарственных препаратов (биоаналогов) до окончания срока, установленного для проведения исследований их биоэквивалентности или терапевтической эквивалентности либо внесения изменений в инструкцию по медицинскому применению в рамках определения взаимозаменяемости».

⁴⁹ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

⁵⁰ Постановление Правительства Российской Федерации от 04.09.2020 № 1357 «Об утверждении Правил использования информации о взаимозаменяемых лекарственных препаратах для медицинского применения и дачи разъяснений по вопросам взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения, а также о внесении изменения в особенности описания лекарственных препаратов для медицинского применения, являющихся объектом закупки для обеспечения государственных и муниципальных нужд».

собой сложную и длительную процедуру с учетом времени, необходимого для проведения соответствующих сравнительных исследований.

Изучение международного опыта по стратегии взаимозаменяемого применения вакцин, вероятно, позволит систематизировать требования к объему исследований, необходимых для подтверждения взаимозаменяемости вакцин, зарегистрированных в Российской Федерации.

Вклад авторов. Н. А. Гаврилова — дизайн статьи, анализ данных литературы, написание текста рукописи; Ю. В. Олефир — критическое обсуждение текста рукописи статьи, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; В. А. Меркулов — критическое обсуждение текста рукописи статьи, редактирование текста рукописи; В. П. Бондарев — интерпретация результатов аналитического исследования, критическое обсуждение содержания рукописи; Е. М. Рычихина — критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; Ю. И. Обухов — анализ материалов статьи, критическое обсуждение и редактирование текста рукописи.

Authors' contributions. Natalia A. Gavrilova—development of the study design, analysis of materials for the paper, writing of the text; Yuri V. Olefir—review of the text of the paper, approval of the final version of the paper for publication; Vadim A. Merkulov—review and revision of the paper; Vladimir P. Bondarev—interpretation of the analytical study results, review of the paper; Ekaterina M. Rychikhina—review and revision of the paper; Yuri I. Obukhov—analysis of materials, review and revision of the paper.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Конфликт интересов. В. А. Меркулов является главным редактором журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». В. П. Бондарев является заместителем главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Vadim A. Merkulov is the Editor-in-chief of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. Vladimir P. Bondarev is the Deputy Editor-in-chief of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Снегирева ИИ, Затолочина КЭ, Дармостукова МА, Аляутдин РН, Романов БК. Современные подходы к взаимозаменяемости вакцин. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(4):3–8 [Snegireva II, Zatolochina KE, Darmostukova MA, Alyautdin RN, Romanov BK. Modern approaches to vaccine interchangeability. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(4):3–8 (In Russ.)]
2. Хотова ТЮ, Снегирева ИИ, Дармостукова МА, Затолочина КЭ, Озерецковский НА, Шалунова НВ, Романов БК. Взаимозаменяемость вакцин против вирусного гепатита В для иммунизации взрослых. *Российский медицинский журнал*. 2016;22(2):85–90. [Khotova TYu, Snegireva II, Darmostukova MA, Zatolochina KE, Ozertskovskiy NA, Shalu-

nova NV, Romanov BK. The interchangeability of vaccines against viral hepatitis B for immunization of adults. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation, Russian Medical Journal*. 2016;22(2):85–90 (In Russ.)]

3. Plotkin SA. Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. *Clin Infect Dis*. 2008;47(3):401–9. <https://doi.org/10.1086/589862>
4. Алексеева ИА, Перелыгина ОВ. Сравнительный анализ использования цельноклеточных и бесклеточных коклюшных вакцин для профилактики коклюшной инфекции. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(4):207–15. [Alekseeva IA, Perelygina OV. Comparative analysis of whole-cell and acellular pertussis vaccines efficacy in preventing pertussis. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(4):207–15 (In Russ.)]
5. Медуницын НВ, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Персональный и коллективный иммунитет при вакцинации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(4):195–207. [Medunitsyn NV, Olefir YuV, Merkulov VA, Bondarev VP. Vaccination contribute to the development of personal and herd immunity. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;16(4):195–207 (In Russ.)]
6. Greenberg DP, Lieberman JM, Marcy SM, Wong VK, Partridge S, Chang SJ, et al. Enhanced antibody responses in infants given different sequences of heterogeneous *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *J Pediatr*. 1995;126(2):206–11. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(95\)70546-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(95)70546-5)
7. Anderson EL, Decker MD, Englund JA, Edwards KM, Anderson P, McInnes P, Belshe RB. Interchangeability of conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccines in infants. *JAMA*. 1995;273(11):849–53. <https://doi.org/10.1001/jama.1995.03520350031024>
8. Piazza M, Abrescia N, Picciotto L, Orlando R, Cerini R, Borgia G, et al. Demonstration of the interchangeability of 2 types of recombinant anti-hepatitis-B vaccine. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1993;69(4):273–80.
9. Bryan JP, Henry CH, Hoffman AG, South-Paul JE, Smith JA, Cruess D, et al. Randomized, cross-over, controlled comparison of two inactivated hepatitis A vaccines. *Vaccine*. 2000;19(7–8):743–50. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00301-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00301-7)
10. Greenberg DP, Pickering LK, Senders SD, Bissey JD, Howard RA, Blatter MM, et al. Interchangeability of 2 diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccines in infancy. *Pediatrics*. 2002;109(4):666–72. <https://doi.org/10.1542/peds.109.4.666>
11. Orsi A, Azzari C, Bozzola E, Chiamenti G, Chirico G, Esposito S, et al. Hexavalent vaccines: characteristics of available products and practical considerations from a panel of Italian experts. *J Prev Med Hyg*. 2018;59(2):E107–19.
12. Feldman S. Interchangeability of vaccines. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20(11):523–9. <https://doi.org/10.1097/00006454-200111001-00004>
13. Greenberg DP, Feldman S. Vaccine interchangeability. *Clin Pediatr (Phila)*. 2003;42(2):93–9. <https://doi.org/10.1177/000992280304200201>
14. Guevara NJ, Borys D, DeAntonio R, Guzman-Holst A, Hoet B. Interchangeability between pneumococcal conjugate vaccines for pediatric use: a systematic literature review. *Expert Rev Vaccines*. 2020;19(11):1011–22. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1688148>
15. Леви ДТ, Обухов ЮИ, Александрова НВ, Волкова РА, Эльберт ЕВ, Альварес Фигероа МВ и др. Оценка полноты и стабильности вакцины БЦЖ методом мультиплексной ПЦР. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(1):49–54. [Levi DT, Obuk-

- hov Yul, Aleksandrova NV, Volkova RA, Elbert EV, Alvarez Figeroa MV, et al. Identity and stability assessment of BCG vaccine by multiplex PCR. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(1):49–54 (In Russ.)]
16. Cassidy A, Mossman S, Olivieri A, De Ridder M, Leroux-Roels G. Hepatitis B vaccine effectiveness in the face of global HBV genotype diversity. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(12):1709–15. <https://doi.org/10.1586/erv.11.151>
17. Чуланов ВП, Семенов ТА, Карандашова ИВ, Комарова СВ, Костюшев ДС, Суслов АП, Волчкова ЕВ. Современный взгляд на проблему выбора вакцины против гепатита В. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017;16(4):65–72. [Chulanov VP, Semenenko TA, Karandashova IV, Komarova SV, Kostyushev DS, Suslov AP, Volchkova EV. Modern view on the problem of choosing a vaccine against hepatitis B. *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2017;16(4):65–72 (In Russ.)] <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-4-65-72>
18. Jose-Abredo A. Some considerations about HBV vaccination among HIV patients from Latin America and the Caribbean. *Ann Hepatol*. 2019;18(5):656–7. <https://doi.org/10.1016/j.aohp.2019.06.005>

Об авторах / Authors

Гаврилова Наталья Андреевна, канд. биол. наук. *Natalia A. Gavrilova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-4624-9189>

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. *Yuri V. Olefir*, Dr. Sci (Med.), Senior Research Associate. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7652-4642>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. *Vadim A. Merkulov*, Dr. Sci (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф. *Vladimir P. Bondarev*, Dr. Sci (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

Рычихина Екатерина Михайловна, канд. биол. наук. *Ekaterina M. Rychikhina*, Cand. Sci. (Biol.). **SPIN-код РИНЦ:** 5025-4368

Обухов Юрий Иванович. *Yuri I. Obukhov*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7729-9800>

Поступила 03.09.2020

После доработки 28.05.2021

Принята к публикации 03.09.2021

Received 3 September 2020

Revised 28 May 2021

Accepted 3 September 2021

Актуальная информация

Новые рекомендации Всемирной организации здравоохранения по редактированию генома

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала два новых доклада¹, в которых содержатся рекомендации, призванные помочь сделать редактирование генома человека инструментом общественного здравоохранения.

Потенциальные преимущества метода редактирования генома включают более быструю и точную диагностику, а также целенаправленное лечение и профилактику генетических заболеваний. Опубликованные доклады содержат рекомендации по управлению и надзору за редактированием генома человека в девяти отдельных областях, включая реестры редактирования генома человека; международные исследования; незаконные, незарегистрированные, незнанные или небезопасные исследования; охрану прав интеллектуальной собственности.

В докладах определены конкретные инструменты, институты и сценарии, обеспечивающие регулирование и надзор за исследованиями, касающимися генома человека. Рекомендации направлены на достижение системных улучшений в целях обеспечения безопасного, эффективного и этичного использования возможностей редактирования генома человека.

¹ <https://www.who.int/ru/news/item/12-07-2021-who-issues-new-recommendations-on-human-genome-editing-for-the-advancement-of-public-health>

Сравнительная характеристика вакцин против COVID-19, используемых при проведении массовой иммунизации

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

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

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

Пандемия начавшегося в декабре 2019 г. в КНР нового коронавирусного заболевания COVID-19 продолжает оказывать огромное воздействие на все сферы деятельности человечества. Коллективный иммунитет, являющийся наиболее эффективным средством предотвращения распространения заболевания, формируется двумя путями — пассивным (формирование невосприимчивого к повторному инфицированию контингента вследствие естественного распространения заболевания) и активным (массовая вакцинация населения). Высокие темпы вакцинации против COVID-19 стали возможны благодаря разработке и массовому производству новых вакцин. Выбор наиболее перспективных платформ для конструирования вакцин является одним из ключевых аспектов проведения успешной массовой вакцинации. Цель работы — сравнительная характеристика вакцин против COVID-19, используемых при проведении массовой иммунизации. В статье рассмотрены технологические платформы, лежащие в основе производства вакцин, эффективность разных типов вакцин по результатам клинических исследований, безопасность вакцин для различных групп населения, а также перспективы расширения производства вакцин для обеспечения необходимого объема вакцинации. В настоящее время в перечень вакцин, уже используемых для проведения массовой иммунизации входят следующие препараты: BNT162b2 (Pfizer/BioNTech), mRNA1273 (Moderna), Гам-КОВИД-Вак (НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи), Ad26.COVS2 (Johnson & Johnson), ChAdOx1-S (AZD1222) (AstraZeneca), BBIBP-CorV (Sinopharm), CoronaVac (Sinovac Biotech) и NVX-CoV2373 (Novavax). Сравнение вакцин, проведенное по основным показателям, показало, что наиболее перспективными типами вакцин для специфической профилактики COVID-19 являются РНК-вакцины и векторные рекомбинантные вакцины на основе аденовирусов.

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-2; массовая иммунизация; РНК-вакцины; векторные рекомбинантные вакцины; инактивированные вакцины; субъединичные вакцины; эффективность вакцины; клинические исследования

Для цитирования: Онищенко ГГ, Сизикова ТЕ, Лебедев ВН, Борисевич СВ. Сравнительная характеристика вакцин против COVID-19, используемых при проведении массовой иммунизации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(3):158–166. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-158-166>

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

Comparative characteristics of COVID-19 vaccines used for mass immunisation

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

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

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

The pandemic of the new coronavirus (COVID-19) disease that began in December 2019 in China is still having a huge impact on all spheres of human life. The herd immunity, which is the most effective tool for preventing the spread of the disease, is formed in two ways: the passive way (i.e., the formation of a population not susceptible to re-infection due to the natural spread of the disease) and the active way (mass immunisation). High rates of COVID-19 vaccination were achieved thanks to the development and mass production of new vaccines. The selection of the most promising vaccine platforms is one of the key aspects of successful mass immunisation. The aim of the study was to compare the characteristics of COVID-19 vaccines used for mass immunisation. The paper analyses the vaccine technology platforms, efficacy of different types of vaccines based on clinical trial results, safety of vaccines for different population groups, and potential for scaling up vaccine production in order to ensure the necessary vaccination coverage. The vaccines currently used for mass immunisation are: BNT162b2 (Pfizer/BioNTech), mRNA1273 (Moderna), Gam-COVID-Vac (N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology), Ad26.COVS2 (Johnson & Johnson), ChAdOx1-S (AZD1222) (AstraZeneca), BBIBP-CorV (Sinopharm), CoronaVac (Sinovac Biotech), and NVX-CoV2373 (Novavax). The comparison of the main characteristics of the vaccines demonstrated that the most promising types of vaccines for COVID-19 specific prophylaxis are RNA vaccines and recombinant adenovirus vector-based vaccines.

Key words: COVID-19; SARS-CoV-2; mass immunisation; RNA vaccines; recombinant vector vaccines; inactivated vaccines; subunit vaccines; vaccine efficacy; clinical trials

For citation: Onishchenko GG, Sizikova TE, Lebedev VN, Borisevich SV. Comparative characteristics of COVID-19 vaccines used for mass immunisation. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(3):158–166. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-158-166>

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

Полтора года назад (11 марта 2020 г.) Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила о начале пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19, которая продолжает оказывать огромное воздействие на все сферы деятельности человечества¹.

Согласно информации ВОЗ, по состоянию на 2 августа 2021 г. в мире с начала пандемии выявлено 198 022 041 заразившихся коронавирусом SARS-CoV-2, в 4 223 460 случаях болезнь закончилась летальным исходом².

Сопоставление количества инфицированных с общей численностью населения указывает на то, что борьба с пандемией займет еще достаточно продолжительное время.

Формирование коллективного иммунитета, необходимого для предотвращения распространения заболевания, происходит двумя путями: за счет естественного распространения заболевания с последующим формированием невосприимчивого к повторному инфицированию контингента, а также путем массовой иммунизации населения.

По данным ВОЗ на 5 февраля 2021 г. количество вакцинированных против COVID-19 впервые превзошло число заразившихся с начала пандемии³. На 2 августа 2021 г. в мире 1 143 446 607 человек (14,7% населения) полностью привиты против COVID-19⁴.

Цель работы — сравнительная характеристика вакцин против COVID-19, используемых при проведении массовой иммунизации.

Характеристика основных типов вакцин против COVID-19

В соответствии с информацией ВОЗ на июль 2021 г. зарегистрированы 22 различные вакцины⁵; кроме того, многие вакцины находятся на стадии доклинического изучения [1, 2]. Вакцины, уже используемые в настоящее время для проведения массовой иммунизации, представлены в таблице 1. Рассматриваемые вакцины относятся к следующим типам:

- РНК-вакцины — BNT162b2 (Pfizer/BioNTech, Германия, США) и mRNA1273 (Moderna, США);
- векторные рекомбинантные вакцины — Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) (НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, Россия), Ad26.COV2.S (Johnson & Johnson, США) и ChAdOx1-S (AZD1222) (AstraZeneca, Великобритания, Швеция);
- инактивированные вакцины — BBIBP-CorV (Sinopharm, Китай) и CoronaVac (Sinovac, Китай);
- субъединичные вакцины — NVX-CoV2373 (Novavax, США).

Вакцинация против COVID-19 может сопровождаться легкими побочными эффектами (небольшое повышение температуры тела или боль, покраснение кожи в месте инъекции), проявление которых в основном зависит от состояния индивидуального организма⁶. Обычно побочные проявления вакцинации носят легкий или умеренный характер и являются непро-

должительными. Серьезные или продолжительные побочные эффекты возникают в очень редких случаях. Тем не менее редкие нежелательные явления в результате использования вакцин, такие как повышенная температура тела, озноб, головная боль, боль в мышцах, боль в месте введения, диарея, являются объектом непрерывного мониторинга со стороны разработчиков вакцин и органов здравоохранения. Вероятность возникновения какого-либо из указанных побочных эффектов может зависеть от конкретной вакцины⁷.

Сведения о количестве проведенных прививок против COVID-19 в ряде стран с наибольшим уровнем заболеваемости представлены в таблице 2.

Идеальная вакцина должна вызывать долговременный иммунитет при однократном введении, обладать перекрестной реактивностью по отношению к различным филогенетическим линиям возбудителя и иметь незначительный риск возникновения поствакцинальных осложнений [12].

При характеристике каждой из указанных в таблице 1 вакцин рассмотрены их технологические платформы; безопасность вакцин для различных групп населения; эффективность вакцин по результатам III фазы клинических исследований; возможность расширения их производства для обеспечения необходимого объема вакцинации.

Вакцина BNT162b2 (Pfizer/BioNTech)

Важным достоинством вакцины на основе РНК является то, что она не содержит ни биологически активного возбудителя, ни его структурных белков, а только фрагменты геномной РНК, кодирующие информацию о строении определенного белка (как правило, используют фрагменты гена, кодирующего S-белок). РНК-вакцины содержат самоамплифицирующуюся мРНК, чувствительную к рибонуклеазам. Для защиты от воздействия последних и для более эффективного введения в клетку создают конструкцию, содержащую упакованную в липосомы мРНК. В случае РНК-вакцины используются ресурсы клетки для синтеза копий целевого вирусного белка.

Основным преимуществом РНК-вакцин на основе нуклеиновых кислот являются следующие: стимуляция как клеточного, так и гуморального иммунного ответа [13]; стимуляция образования интерферона 1-го типа [14]; возможность проведения быстрой модификации вакцины в случае проявления мутационной изменчивости в ходе естественной эволюции вируса SARS-CoV-2, которая может привести к появлению варианта с комплексом новых свойств; отсутствие так называемого антивекторного иммунитета, который может существенно снизить эффективность вакцин [14]; расщепление рибонуклеазами препятствует накоплению мРНК в макроорганизме.

В качестве определенного недостатка РНК-вакцин следует считать отсутствие (на момент возникновения пандемии

¹ [https://www.who.int/ru/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/ru/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov))

² <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>

³ <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19-5-february-2021>

⁴ <https://gogov.ru/covid-v-stats/world>

⁵ https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/Status_COVID_VAX_15July2021.pdf

⁶ [https://www.who.int/ru/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines-safety](https://www.who.int/ru/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines-safety)

⁷ Там же.

Таблица 1. Характеристики вакцин против COVID-19, используемых в мире при проведении массовой иммунизации
Table 1. Characteristics of COVID-19 vaccines used globally for mass immunisation

Наименование вакцины Vaccine	Производитель вакцины Vaccine manufacturer	Характеристика вакцин Characteristics of vaccines							Источник Reference
		Тип вакцины Type of vaccine	Технологическая платформа Technology platform	Количество введений Num-ber of vaccine doses	Эффективность, % Efficacy, %	Температура хранения, °C Storage temperature, °C	Количество участников исследований III фазы Number of subjects in phase III clinical trials	Количество заболевших в группе вакцинированных / в группе плацебо Number of COVID-19 cases in the vaccinated group / in the placebo group	
BNT 162b2	Pfizer/BioNTech	РНК-вакцина RNA vaccine	Липидные наночастицы, содержащие мРНК Lipid nanoparticles containing mRNA		95	-70	43548	8 / 162	[3]
mRNA 1273	Moderna				94	-20	30420	11 / 185	[4]
Гам-КОВИД-Бак Gam-COVID-Vac	НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи N.F. Gama-leya National Research Center for Epidemiology and Microbiology	Векторная рекомбинантная вакцина Recombinant vector vaccine	Аденовирусные векторы Ad26 и Ad5, содержащие вставку гена S-белка вируса SARS-CoV-2 Ad26 and Ad5 adenovirus vectors containing the S protein gene of SARS-CoV-2	2	92	-18	19886	16 / 62	[5]
Ad26.COV2.S	Johnson & Johnson		Аденовирусный вектор Ad26, содержащий вставку гена S-белка вируса SARS-CoV-2 Ad26 adenovirus vector containing the S protein gene of SARS-CoV-2	1	66	-20	43783	66 / 193	[6]
ChAdOx1-S (AZD1222)	Astra Zeneca	Инактивированная вакцина Inactivated vaccine	Аденовирусный вектор ChAdOx1 nCoV-19, содержащий вставку гена S-белка вируса SARS-CoV-2 ChAdOx1 nCoV-19 adenovirus vector containing the S protein gene of SARS-CoV-2	2	70,4	2-8	11 636	30 / 101	[7]
BBIBP-CorV	Sinopharm		Инактивированный вирус SARS-CoV-2 Inactivated SARS-CoV-2 virus		79		НД ND	НД ND	[8, 9] Сноска ⁸ Footnote ⁸
CoronaVac	Sinovac Biotech	Субъединичная белковая вакцина Protein subunit vaccine	Рекомбинантный S-белок вируса SARS-CoV-2, наночастицы с адъювантом Recombinant S protein of SARS-CoV-2, nanoparticles with an adjuvant		50,7		12396	85 / 168	[10]
NVX-CoV2373	Novavax				89,7		15187	10 / 96	[11]

Примечание. НД — нет данных.
Note. ND—no data available.

⁸ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04560881>

Таблица 2. Данные о вакцинации против COVID-19 в ряде стран с наибольшим уровнем заболеваемости (по состоянию на 06.08.2021)⁹

Table 2. Data on COVID-19 vaccination rates in a number of countries with the highest incidence (as of 6 August 2021)⁹

Страна Country	Количество привитых, млн Number of vaccinated, mln	Доля вакцинированных от общей численности населения, % Proportion of vaccinated people in the total population, %
КНР China	622	43,2
Индия India	385,6	27,9
США USA	193,2	58,4
Бразилия Brazil	108	50,8
Германия Germany	51,6	61,6
Великобритания Great Britain	46,9	69,1
Франция France	43,6	66,9
Турция Turkey	41,3	49,0
Италия Italy	39,2	64,8
Российская Федерация Russian Federation	38,1	26,0
Испания Spain	32,9	70,4
Канада Canada	27,1	71,9
ОАЭ UAE	7,9	79,8
Израиль Israel	5,8	67,0

COVID-19) данных тестирования препаратов этого класса на представительных по численному составу группах добровольцев. Следовательно, не исключена вероятность развития непредсказуемых редких серьезных реакций на введение вакцин; потенциальным последствием введения мРНК-вакцин могут стать аутоиммунные реакции и образование тромбов [14]. Низкая стабильность РНК-вакцины приводит к серьезным логистическим проблемам при их изготовлении и практическом использовании в ходе проведения массовой иммунизации.

Эффективность вакцины BNT162b2 не зависела от расовой и гендерной принадлежности, а также от возраста привитых. На первом этапе клинических исследований эффективность вакцины превысила 90% [15]. В ходе финальной стадии исследований вакцины BNT162b2 оценка ее эффективности составила 95% [3]. Было выявлено 170 случаев заражения участников тестирования вирусом SARS-CoV-2, при этом 162 случая пришлись на группу плацебо и только 8 (в том числе одно тяжелое заболевание) на группу участников клинических исследований, которым вводили вакцину. По данным компании Pfizer, эффективность вакцины для людей старше 65 лет составила 94%. При этом участники исследований, относящиеся к данному возрастному контингенту, легче переносили вакцинацию, о чем свидетельствует меньшее (для данной группы) количество жалоб на побочные эффекты, к которым относятся головная боль (у 2% участников исследования после введения

второй дозы вакцины), повышенная утомляемость (у 3,8% после введения первой или второй дозы вакцины)¹⁰.

Исследования вакцины производства Pfizer/BioNTech, зарегистрированной в декабре 2020 г., позволили сделать вывод о том, что вакцина обеспечивает иммунитет на четыре-пять месяцев, после чего может возникнуть необходимость проведения повторной иммунизации. После проведения масштабной [16] иммунизации данной вакциной в Израиле зафиксировали спад числа заражений и госпитализаций больных COVID-19. Национальная программа вакцинации в Израиле началась 20 декабря 2020 г. Снижение числа новых случаев заболевания и госпитализированных пациентов произошло уже через три недели после начала кампании [17]. В ходе проведения масштабной иммунизации вакциной BNT162b2 в Израиле выявлено, что эффективность вакцинации зависит от правильности транспортировки, хранения препарата и возраста пациентов. Пожилые люди потенциально имеют пониженную или отсроченную реакцию на введение вакцины из-за возрастных особенностей их иммунной системы [17].

Необходимо отметить, что в ходе проведения масштабной иммунизации вакциной BNT162b2 в отличие от данных, полученных в ходе проведения фазы III клинических исследований, были зарегистрированы серьезные побочные эффекты¹¹. Так, были зарегистрированы случаи паралича лица у 13 граждан Израиля [16]. Было зарегистрировано 29 летальных случаев

⁹ <https://gogov.ru/covid-v-stats/ssha#data>

¹⁰ <https://www.fda.gov/media/144337/download>

¹¹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04368728>

в Норвегии¹² и 55 — в США¹³, однако непосредственная связь вакцинации с гибелью людей ни в одном случае не была установлена.

Было показано, что вакцина производства Pfizer/BioNTech эффективна против новых штаммов коронавируса, обнаруженных в Великобритании и Южно-Африканской Республике (ЮАР), имеющих общую мутацию N501Y (замена аспарагина на тирозин в 501 аминокислотной позиции S-белка), поскольку выявлено, что в сыворотках крови 20 участников исследования обнаружены эквивалентные титры вируснейтрализующих антител против вирусов SARS-CoV-2, в геном которых имеются мутации N501 и Y501 [18].

Существуют факторы, которые могут затруднить применение рассматриваемой вакцины, так же как и других РНК-вакцин. Первым из таких факторов является ограниченная возможность расширения производственной базы для выпуска вакцины в связи со сложностью получения ее в промышленных масштабах и трудность масштабирования технологии получения препарата, связанная с использованием новой технологической платформы, не применявшейся ранее и не имеющей широкого распространения в биотехнологических производствах. Вторым фактором является то, что вакцина BNT162b2 при транспортировке и хранении требует соблюдения температурного режима –70 °С. Даже в условиях использования низкотемпературных холодильников с поддерживаемой температурой –20 °С будет происходить разрушение липидной капсулы, предохраняющей мРНК от действия рибонуклеаз. Данное обстоятельство в значительной мере осложняет транспортировку вакцины от производства до проведения иммунизации и ограничивает возможность ее реализации лишь странами с развитой инфраструктурой здравоохранения при относительно небольшой территории.

Вакцина mRNA1273 (Moderna)

В состав вакцины mRNA1273 входит мРНК, кодирующая ген S-белка вируса SARS-CoV-2. По механизму действия она сходна с вакциной производства Pfizer/BioNTech.

По данным, полученным в ходе клинических исследований mRNA1273, реакция в поствакцинальный период была незначительной и непродолжительной [19]. У 9,7% человек была зафиксирована общая слабость и повышенная утомляемость. У 2,2% участников исследований отмечена миалгия, артралгия, в единичных случаях — паралич лицевого нерва. После вакцинации были зафиксированы и 9 летальных случаев, однако их связь непосредственно с вакцинацией не была установлена¹⁴.

Во время проведения III фазы клинических исследований на 30420 добровольцах COVID-19 был диагностирован у 196 человек (в группе плацебо — 185 случаев, в группе с введением вакцины — 11) [4]. Заявленная эффективность вакцины составила 94,5%.

Преимущества и недостатки вакцины mRNA1273 сходны с таковыми для вакцины производства Pfizer/BioNTech. Однако важным достоинством вакцины mRNA1273 является то, что ее можно хранить при температуре 2–8 °С (температура холодильной камеры бытового холодильника) до 30 суток или при –20 °С (температура морозильной камеры бытового холодиль-

ника) до 6 месяцев. Данное обстоятельство значительно улучшает логистику указанной вакцины.

Вакцина Гам-КОВИД-Вак (НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалени)

Вакцина Гам-КОВИД-Вак (Спутник V), как и вакцины Ad26.COV2.S (Johnson & Johnson), ChAdOx1-S (AZD1222) (AstraZeneca), относится к векторным рекомбинантным вакцинам. При конструировании таких вакцин против COVID-19 в качестве вектора используют тот или иной безопасный для человека аденовирус, в геном которого встроен ген SARS-CoV-2, кодирующий S-белок, входящий в состав оболочки коронавируса. При проникновении вектора в клетки запускается процесс экспрессии целевого белка с последующим формированием иммунного ответа [5, 20].

Безопасность аденовирусных векторов для создания вакцин на их основе достаточно хорошо изучена в клинической практике [21–23]. Векторная вакцина на основе аденовируса индуцирует как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. Иммунитет формируется после однократной иммунизации, проведение же двукратной иммунизации обеспечивает формирование долговременного иммунитета. Значительным преимуществом вакцины Гам-КОВИД-Вак является использование схемы гетерологичной прайм-буст иммунизации двумя аденовирусными векторами разных серотипов. Подобный подход не используется ни в одной другой вакцине как от COVID-19, так и от других инфекционных заболеваний. Применяемый подход позволяет нивелировать иммунный ответ на аденовирусный вектор при введении второй дозы препарата, а следовательно, значительно повысить эффективность иммунизации. Схема вакцины Гам-КОВИД-Вак представлена на рисунке 1.

Вакцина Гам-КОВИД-Вак разработана на технологической платформе, которую ранее использовали для создания вакцин против лихорадки Эбола, ближневосточного респираторного синдрома (MERS), лихорадки Ласса¹⁵. Как было указано ранее, использование аденовирусного вектора позволяет стимулировать оба вида иммунитета: клеточный и гуморальный, при этом активация происходит с использованием естественных механизмов иммунитета человека, который на протяжении всей эволюции совершенствовался для борьбы с вирусами.

Проверка иммуногенности данной вакцины проведена с помощью иммуноферментного анализа путем определения различных изотипов IgG антител к полноразмерному S-белку и рецептор-связывающему домену (RBD) данного белка, а также в реакции нейтрализации при определении вируснейтрализующих антител (ВНА). Кроме того, регистрировали Т-клеточный иммунный ответ по пролиферации CD4-и CD8-клеток и по продукции гамма-интерферона [6, 20].

При проведении клинических исследований III фазы участники были случайным образом распределены на группу с введением вакцины и группу плацебо (соотношение численности 3:1) с распределением по возрастам. Вакцину вводили внутримышечно в дозе 0,5 мл в режиме праймирования-бустирования с 21-суточным интервалом между первой дозой (аденовирус 26 типа) и второй дозой (аденовирус 5 типа), оба вектора содержали полноразмерный ген S-белка вируса SARS-CoV-2. Эффективность вакцинации определяли по соотношению участников в указанных группах, которые через 21 сутки после получения первой дозы вакцины заболели COVID-19 (с под-

¹² <https://www.fda.gov/media/144246/download#page=50>

¹³ <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/ensuringsafety/monitoring/vaers/publications.html>

¹⁴ <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/wr/mm7013e3.htm#suggestedcitation>

¹⁵ <https://sputnikvaccine.com/rus/about-vaccine/human-adenoviral-vaccines/>

¹⁶ <http://grls.rosminzdrav.ru/>

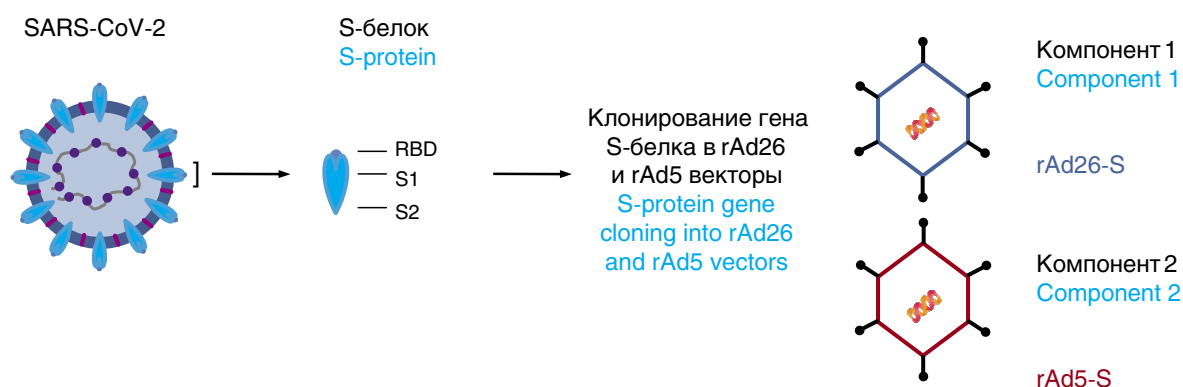


Рис. 1. Вакцина для профилактики COVID-19 Гам-КОВИД-Вак (схема). RBD — рецептор-связывающий домен S-белка вируса SARS-CoV-2; S1, S2 — субъединицы S-белка вируса SARS-CoV-2.

Fig. 1. COVID-19 vaccine Gam-COVID-Vac (scheme). RBD—receptor-binding domain of the S-protein of the SARS-CoV-2 virus; S1, S2—subunits of the S-protein of the SARS-CoV-2 virus.

тверждением наличия РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР в реальном времени) [5].

После введения второй дозы у 16 из 14964 человек в группе с введением вакцины и у 62 из 4902 в группе плацебо был диагностирован COVID-19 [5]. Эффективность вакцинации составила 91,6% (I_{95} 85,6–95,2%). У 45 участников в группе с введением вакцины (0,3%) и у 23 участников в группе плацебо, были зарегистрированы осложнения (незначительное повышение температуры тела, головная боль), для которых, однако, не установлена связь с проведенной вакцинацией [5].

В настоящее время зарегистрирована лиофилизированная форма вакцины (Гам-КОВИД-Вак-Лео) с температурным режимом хранения 2–8 °C и сроком хранения до 6 месяцев¹⁶. Однако основной используемой вакциной в настоящее время является Гам-КОВИД-Вак с условием хранения не выше –18 °C, что, вероятно, связано с невозможностью оперативного выпуска больших количеств лиофилизированной формы, что критически важно для скорейшей иммунизации в условиях пандемии.

Вакцина Ad26.COVS.2 (Johnson & Johnson)

Вакцина представляет рекомбинантный аденовирус человека 26 типа, содержащий вставку гетерологичной ДНК, кодирующей синтез S-белка оболочки вируса SARS-CoV-2. Рекомбинантный аденовирус модифицирован таким образом, что при вакцинации в организме человека не происходит его репликации. ДНК в вакцине более устойчива, чем мРНК, а кроме того, защищена от разрушения оболочкой аденовируса. Вакцину можно хранить после размораживания в течение 3 месяцев при температуре бытового холодильника (2–8 °C). Поскольку для проведения эффективной вакцинации требуется всего одна инъекция¹⁷, ожидается, что данная вакцина будет пользоваться большим спросом, чем вакцины производства Pfizer/BioNTech и Moderna.

Вакцина производства Johnson & Johnson проходила клинические исследования фазы III в разных регионах, при этом показатель ее защитной эффективности составил от 57 до 72% [6]. Защита от вируса у добровольцев появилась через две недели после прививки. В клинических исследованиях участвовали

43783 человека из разных стран мира. Данные защитной эффективности по регионам: США — 72%, страны Южной Америки — 66%, Южной Африки — 57%¹⁸.

Вакцина AZD1222 (AstraZeneca)

При конструировании вакцины AZD1222 британско-шведской компании AstraZeneca в качестве рекомбинантного вектора использован аденовирус шимпанзе ChAdOx1 со встроенным геном S-белка вируса SARS-CoV-2. Отличительной от вакцины Гам-КОВИД-Вак особенностью вакцины AZD1222 является использование в качестве вектора аденовируса шимпанзе, а не человека, что должно снизить риски возникновения как нежелательных иммунных реакций, так и снижения эффективности иммунизации вследствие наличия у вакцинированного предсуществующего иммунитета к вектору, сформировавшегося вследствие ранее перенесенной аденовирусной инфекции [24]. В то же время такой иммунитет против вектора может сформироваться после первой иммунизации вакциной AZD1222, следствием чего может стать снижение эффективности повторной и последующих иммунизаций¹⁹.

Схема использования вакцины AZD1222: двукратное введение, праймирование в дозе $5,0 \times 10^{10}$, бустирование — $2,5 \times 10^{10}$ вирусных частиц (в пересчете на рекомбинантный вирус)²⁰.

При проведении клинических исследований III фазы установлена различная эффективность вакцины AZD1222 при разных схемах применения. В случае если первая и вторая дозы вакцины были полными, эффективность составила 62% (по данным при проведении исследований на 8895 добровольцах) [7]. При использовании схемы «половинная первая доза — полная вторая доза» эффективность вакцинации была на уровне 90% (по данным при проведении исследований на 2741 добровольце). Средняя эффективность вакцины AZD1222 определена равной 70% [7]. Это выше, чем порог эффективности 50%, установленный ВОЗ как минимальный для вакцин.

Выявленные побочные реакции при проведении иммунизации вакциной AZD1222: покраснение и неприятные ощущения в месте укола, головная и мышечная боль [7]. При этом поствакцинальные осложнения у пожилых пациентов (старше 65 лет) проявлялись реже и были менее выражены.

¹⁷ <https://www.jnj.com/johnson-johnson-covid-19-vaccine-authorized-by-u-s-fda-for-emergency-use-first-single-shot-vaccine-in-fight-against-global-pandemic>

¹⁸ <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-issues-emergency-use-authorization-third-covid-19-vaccine>

¹⁹ <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/339882/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-AZD1222-background-2021.2-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

²⁰ Там же.

Во время проведения клинических исследований вакцины AZD1222 был зарегистрирован случай воспаления спинного мозга у одного из участников эксперимента, завершившийся гибелью пациента. До тех пор пока эксперты не установили, что воспаление не связано с прививкой, исследование было приостановлено [25].

ЮАР отказалась от применения вакцины AZD1222 ввиду неэффективности препарата против южноафриканского штамма вируса SARS-CoV-2²¹ [26]. На использование вакцины вводили временный запрет в ряде стран, в том числе Германии, Франции и Италии. Это решение было принято на фоне сообщений о развитии тромбозов у вакцинированных²².

Вакцины BBIBP-CorV (Sinopharm) и CoronaVac (Sinovac Biotech)

Оба препарата, относящиеся к инактивированным вакцинам, разработаны фармацевтическими компаниями КНР. Технология получения инактивированных вакцин давно отработана и проверена годами применения таких препаратов.

Основой вакцин данного класса являются инактивированные вирионы коронавируса, к структурным белкам которого формируется иммунный ответ при парентеральном введении препарата. Инактивированные препараты более безопасны по сравнению с векторными рекомбинантными вакцинами, но обычно менее иммуногенны, поскольку в процессе вакцинации в макроорганизме не происходит трансляции вирусных антигенов. Применение инактивированных вакцин обычно включает курс из нескольких инъекций, проводимых с определенной периодичностью. Достоинством инактивированных вакцин является то, что в цельновирионной инактивированной вакцине представлено максимальное число вирусных структурных белков по сравнению с РНК-вакциной или векторными рекомбинантными вакцинами, что определяет возникновение более выраженного гуморального иммунного ответа на вирусные белки, который сопоставим с таковым при естественной инфекции.

Особенностью проведения исследований вакцин BBIBP-CorV (Sinopharm) и CoronaVac (Sinovac) стало то, что, хотя Китай первым стал разрабатывать и исследовать вакцины против COVID-19, на момент начала III фазы клинических исследований в КНР резко снизилось число новых случаев заболевания. В связи с отсутствием подходящих условий для проведения данной фазы клинических исследований последние были проведены преимущественно в других странах.

В июле 2020 г. в КНР была проведена регистрация и выдача разрешения на применение вакцины производства Sinopharm. Эффективность инактивированной вакцины производства Sinopharm по данным III фазы клинических исследований составила 79,34%, доля привитых с выявленной конверсией вируснейтрализующих антител — 99,52%²³. В ходе клинических исследований побочных эффектов у вакцинированных не выявлено²⁴ [8–10].

В соответствии с данными клинических исследований вакцины CoronaVac (Sinovac), которые были проведены индонезийской фармацевтической компанией Bio Farma, продемонстрировано, что эффективность вакцины составила 97% [27].

Однако в дальнейших исследованиях эффективности этой вакцины при ее практическом применении в различных регионах получены противоречивые данные. Так, в Индонезии вакцина производства Sinovac показала эффективность в 65,3% случаев²⁵, в Турции — в 91,5% [28]. Бразильский исследовательский институт Бутантан в Сан-Паулу сообщил, что эффективность вакцины производства Sinovac в клинических исследованиях в Бразилии оказалась почти на 30% ниже той, о которой заявляли ранее, и составляла только 50,4% [10]. Вместе с тем у вакцинированных не были выявлены тяжелые случаи заболевания²⁶.

Необходимо отметить, что существенным недостатком инактивированных вакцин против COVID-19 является относительно низкий уровень содержания вируса SARS-CoV-2 при его культивировании в клетках-продуцентах, что будет препятствовать наработке объема вирусной биомассы, необходимого для производства больших объемов вакцин.

Вакцина NVX-CoV2373 (Novavax)

Вакцина NVX-CoV2373 фармацевтической компании Novavax (США) относится к классу белковых субъединичных вакцин, содержащих необходимые для стимуляции иммунного ответа фрагменты вирусных белков, которые сейчас получают с помощью экспрессии генно-инженерных конструкций *in vitro*. В отличие от других классов вакцин, иммунный ответ при вакцинации субъединичными вакцинами формируется только на содержащиеся в их составе эпитопы S-белка вируса SARS-CoV-2. При проведении III фазы клинических исследований вакцины NVX-CoV2373 (Novavax) установлена эффективность, составившая 89,7% [11].

Важным достоинством данной вакцины является способность выработки иммунитета у вакцинированных к новым штаммам коронавируса. Согласно имеющимся данным, эффективность вакцины производства Novavax против исходного штамма вируса SARS-CoV-2 составляла 95,6%, а против более контагиозного штамма вируса B.1.1.7, выявленного в Великобритании, — 85,6%; против южноафриканского штамма возбудителя COVID — 19–60%. Возможным фактором, повлиявшим на пониженную величину последнего показателя, стало наличие ВИЧ у части добровольцев, поскольку эффективность вакцины среди данной группы составила всего 49,4% [29].

Заключение

Основной задачей, стоящей перед здравоохранением в связи с пандемией COVID-19, является проведение в очень сжатые сроки массовой вакцинации, необходимой для остановки распространения заболевания. С решением подобного рода задачи здравоохранение столкнулось впервые. Разработка и внедрение в практику здравоохранения вакцин против нового возбудителя проводились в условиях пандемии и быстрого распространения инфекции.

Общей проблемой всех разработанных вакцин является недостаточный масштаб производства, что может приводить к задержкам поставок требуемого количества доз вакцин на фармацевтический рынок. При существующих темпах вакцинации против COVID-19 для создания необходимого уровня

²¹ <https://www.sciencemag.org/news/2021/02/south-africa-suspends-use-astrazenecas-covid-19-vaccine-after-it-fails-clearly-stop>

²² <https://www.ema.europa.eu/en/news/astrazeneca-covid-19-vaccine-review-very-rare-cases-unusual-blood-clots-continues>

²³ <https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/sinopharm-covid-19-vaccine-bbip-corv>

²⁴ <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/341252/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-BIBP-background-2021.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

²⁵ https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/sage/2021/april/5_sage29apr2021_critical-evidence_sinovac.pdf

²⁶ Там же.

коллективного иммунитета потребуется не меньше 2 лет. Угроза продолжения пандемии может быть связана с вероятностью спонтанного возникновения нового, более вирулентного или контагиозного для человека штамма вируса SARS-CoV-2, примерами которых являются британский штамм B.1.1.7 и вариант Дельта B.1.617.2, впервые выявленный в Индии. В связи с этим на первое место выходят аспекты масштабируемости технологии производства вакцин, а также возможность гибкой и быстрой адаптации технологии производства вакцин к новым штаммам коронавируса.

Для проведения массовой иммунизации лидирующее положение в мире занимают рассмотренные в обзоре вакцины, относящиеся к четырем основным типам: РНК-вакцины, векторные рекомбинантные вакцины, инактивированные вакцины и субъединичные вакцины. Именно эти вакцины с большой вероятностью способны занять около 90% фармацевтического рынка. В настоящее время в плане решения задач увеличения масштаба производства наибольшие перспективы имеют РНК-вакцины и векторные рекомбинантные вакцины, наработка которых может быть осуществлена экстенсивными методами за счет передачи от разработчика вакцины лицензии на производство препарата другим производителям, располагающим необходимыми производственными мощностями.

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

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

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

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

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

Литература/References

1. Kumar A, Dowling WE, Román RG, Chaudhari A, Gurry C, Le TT, et al. Status report on COVID-19 vaccines development. *Curr Infect Dis Rep*. 2021;23(6):9. <https://doi.org/10.1007/s11908-021-00752-3>
2. Kim JH, Marks F, Clemens JD. Looking Beyond COVID-19 vaccine phase 3 trials. *Nat Med*. 2021;27:205–11. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01230-y>
3. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*. 2020;383(27):2603–15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
4. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med*. 2021;384(5):403–16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
5. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*. 2021;397(10275):671–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
6. Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cárdenas V, Shukarev G, Grinsztejn B, et al. Safety and efficacy of single-dose Ad26.COV2.S vaccine against Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384(23):2187–201. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101544>
7. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet*. 2021;397(10269):99–111. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32661-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32661-1)
8. Cohen J. China's vaccine gambit. *Science*. 2020;370(6522):1263–7. <https://doi.org/10.1126/science.370.6522.1263>
9. Xia S, Zhang Y, Wang Y, Wang H, Yang Y, Gao GF, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2021;21(1):39–51. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30831-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30831-8)
10. Palacios R, Patiño EG, de Oliveira Pirelli R, Conde MTRP, Batista AP, et al. Double-blind, randomized, placebo-controlled phase III clinical trial to evaluate the efficacy and safety of treating healthcare professionals with the adsorbed COVID-19 (inactivated) vaccine manufactured by Sinovac-PROFISCOV: a structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2020;21(1):853. <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04775-4>
11. Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, Boffito M, Browne D, Burns F, et al. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*. 2021;NEJMoa2107659. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107659>
12. Онищенко ГГ, Сизикова ТЕ, Лебедев ВН, Борисевич СВ. Анализ перспективных направлений создания вакцин против COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(4):216–27. [Onishchenko GG, Sizikova TE, Lebedev VN, Borisevich SV. Analysis of promising approaches to COVID-19 vaccine development. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):216–27 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-216-227>
13. Hobernik D, Bros M. DNA vaccines — how far from clinical use? *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3605. <https://doi.org/10.3390/ijms19113605>
14. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(4):261–79. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
15. Khehra N, Padda I, Jaferi U, Atwal H, Narain S, Parmar MS. Tozinameran (BNT162b2) vaccine: the journey from preclinical research to clinical trials and authorization. *AAPS PharmSciTech*. 2021;22(5):172. <https://doi.org/10.1208/s12249-021-02058-y>
16. Dagan N, Barda N, Kepten E, Miron O, Perchik S, Katz MA, et al. BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine in a nationwide mass vaccination setting. *N Engl J Med*. 2021;384(15):1412–23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101765>
17. Wise J. Covid-19: Pfizer BioNTech vaccine reduced cases by 94% in Israel, shows peer reviewed study. *BMJ*. 2021;372:n567. <https://doi.org/10.1136/bmj.n567>
18. Xie X, Liu Y, Liu J, Zhang X, Zou J, Fontes-Garfias CR, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 spike 69/70 deletion, E484K

- and N501Y variants by BNT162b2 vaccine-elicited sera. *Nat Med*. 2021;27(4):620–1. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01270-4>
19. Thompson MG, Burgess JL, Naleway AL, Tyner HL, Yoon SK, Meece J, et al. Interim estimates of vaccine effectiveness of BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 vaccines in preventing SARS-CoV-2 infection among health care personnel, first responders, and other essential and front-line workers — Eight U.S. locations, December 2020–March 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2021;70(13):495–500. <http://doi.org/10.15585/mmwr.mm7013e3>
20. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020;396(10255):887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
21. Wold WS, Toth K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2013;13:421–33. <https://doi.org/10.2174/1566523213666131125095046>
22. Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med*. 2004;6(S1):S164–71. <https://doi.org/10.1002/jgm.496>
23. Ковыршина АВ, Должикова ИВ, Гроусова ДМ, Баясин МВ, Ботиков АГ, Панина ЛВ и др. Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КоВ. *Иммунология*. 2020;41(2):135–43. [Kovyrshina AV, Dolzhikova IV, Grousova DM, Balyasin MV, Botikov AG, Panina LV, et al. A heterologous virus-vectored vaccine for prevention of Middle East respiratory syndrome induces long protective immune response against MERS-CoV. *Immunologiya = Immunology*. 2020;41(2):135–43. (In Russ.)] <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-135-143>
24. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belli-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020;396(10249):467–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)
25. Román GC, Gracia F, Torres A, Palacios A, Gracia K, Harris D. Acute transverse myelitis (ATM): clinical review of 43 patients with COVID-19-associated ATM and 3 post-vaccination ATM serious adverse events with the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222). *Front Immunol*. 2021;12:653786. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.653786>
26. Madhi SA, Baillie V, Cutland CL, Voysey M, Koen AL, Fairlie L, et al. Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 Covid-19 vaccine against the B.1.351 variant. *N Engl J Med*. 2021;384(20):1885–98. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2102214>
27. Xia S, Duan K, Zhang Y, Zhao D, Zhang H, Xie Z, et al. Effect of an inactivated vaccine against SARS-CoV-2 on safety and immunogenicity outcomes: interim analysis of 2 randomized clinical trials. *JAMA*. 2020;324(10):951–960. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.15543>
28. Tanriover MD, Doğanay HL, Akova M, Güner HR, Azap A, Akhan S, et al. Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. *Lancet*. 2021;398(10296):213–22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01429-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01429-X)
29. Callaway E, Mallapaty S. Novavax offers first evidence that COVID vaccines protect people against variants. *Nature*. 2021;590(7844):17. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-00268-9>

Об авторах / Authors

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

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

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

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

Поступила 13.05.2021

После доработки 06.08.2021

Принята к публикации 03.09.2021

Received 13 May 2021

Revised 6 August 2021

Accepted 3 September 2021

Мировая практика научного консультирования по вопросам разработки и регистрации инновационных препаратов

Е. В. Мельникова^{1,*}, О. В. Меркулова¹, В. А. Меркулов^{1,2}

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

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

Современные вызовы здравоохранению, связанные как с появлением новых заболеваний, так и с отсутствием терапии для уже известных заболеваний и жизнеугрожающих состояний, выявлением пациентов, не реагирующих на стандартные подходы лечения, с одной стороны, и развитие научного представления о патогенезе заболеваний, препаратах/методах лечения, причинах отсутствия ответа на терапию, активное внедрение в клиническую практику достижений молекулярной биологии и генетической инженерии, с другой стороны, создают условия и возможности для поиска инновационных препаратов для медицинского применения. Относительно новым классом являются препараты на основе клеток и тканей человека (в соответствии с российским законодательством — биомедицинские клеточные продукты, БМКП). Однако невозможность четкого прогнозирования эффективности и финансовой привлекательности таких препаратов для фармацевтических компаний, а также значительные трудовые и финансовые затраты, связанные с их разработкой и внедрением в клиническую практику, являются ощутимыми барьерами для вывода их на фармацевтический рынок. Цель работы — анализ нормативно-правовой базы зарубежных регуляторных органов и опыта их научного консультирования в ходе разработки и вывода на фармацевтический рынок препаратов на основе клеток и тканей человека, что может быть использовано в практике консультирования экспертным учреждением разработчиков БМКП. В статье представлены данные анализа нормативных документов, регламентирующих процедуру научного консультирования регуляторными органами ЕС, США, России, а также проанализировано содержание консультаций для разрешенных к применению в медицинской практике ЕС и США препаратов на основе клеток и тканей человека. Практика консультирования зарубежными регуляторными органами показывает, что наибольшее количество консультаций было проведено по препаратам на основе генетически модифицированных клеток человека для лечения онкологических и генетических заболеваний. Вопросы преимущественно касались состава спецификации на готовый препарат, оценки безопасности, сокращения программ доклинических исследований ввиду отсутствия релевантных моделей животных или заболеваний, а также количества пациентов, конечных точек эффективности в клинических исследованиях, оценки появления репликационно-компетентных ретровирусов.

Ключевые слова: инновационные препараты; препараты на основе клеток и тканей человека; биомедицинские клеточные продукты; научные консультации; поддержка в рамках протокола

Для цитирования: Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Меркулов ВА. Мировая практика научного консультирования по вопросам разработки и регистрации инновационных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(3):167–177. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-167-177>

* **Контактное лицо:** Мельникова Екатерина Валерьевна; melnikovaev@expmed.ru

World practice of providing scientific advice on the development and authorisation of innovative medicines

E. V. Melnikova^{1,*}, O. V. Merkulova¹, V. A. Merkulov^{1,2}

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

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

Current challenges to healthcare, i.e. the emergence of new diseases, lack of therapies for known diseases and life-threatening conditions, identification of patients who do not respond to standard treatment, on the one hand, and the evolution of scientific understanding of disease processes, medicines, therapies, causes of treatment failures, and implementation in clinical practice of innovations related to molecular biology and genetic engineering, on the other hand, create conditions and opportunities for the development of innovative medicinal products. A relatively new class of medicines is based on human cells and tissues (the term used in Russian legislation is biomedical cell products, BCP). However, the inability to accurately predict the efficacy and financial rewards of such medicines for pharmaceutical companies, as well as significant labour and financial costs associated with their development and clinical use, hinder their entry into the market. The aim of the study was to analyse the foreign regulatory setting for the development and launch of human cell- and tissue-based products, as well as approaches of foreign regulatory authorities

to scientific advice, which can be drawn upon by the Russian expert authority when providing advice to BCP developers. The paper summarises the results of analysis of regulations establishing the procedure for providing scientific advice by EU, USA, and Russian regulatory authorities, and analyses the advice provided for the human cell- and tissue-based products which are now authorised in the EU and USA. The analysis of advice provided by foreign regulatory authorities shows that the largest number of consultations were given for medicinal products based on genetically modified cells for the treatment of cancer and genetic diseases. The questions were mainly related to the contents of specifications for finished pharmaceutical products, safety evaluation, curtailing of preclinical studies due to the lack of relevant animal/disease models, the number of subjects and efficacy endpoints in clinical studies, assessment of the appearance of replication-competent retroviruses.

Key words: innovative medicines; human cell- and tissue-based products; biomedical cell products; scientific advice; protocol assistance

For citation: Melnikova EV, Merkulova OV, Merkulov VA. World practice of providing scientific advice on the development and authorisation of innovative medicines. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(3):167–177. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-167-177>

***Corresponding author:** Ekaterina V. Melnikova; melnikovaev@expmed.ru

Сложность состава препаратов на основе клеток и тканей человека (аналогов биомедицинских клеточных продуктов, БМКП) — наличие жизнеспособных клеток со своим набором генов и секретируемых факторов, обуславливает определенные риски их применения в медицинской практике, связанные, главным образом, с возможностью проявления опухолевого и онкогенного потенциала. Большой проблемой является и невозможность стандартизации как производства, так и конечного продукта в большинстве случаев (особенно для аутологических препаратов, когда характеристики и объем конечного продукта могут значительно варьировать) [1]. Кроме того, не всегда требования нормативных документов по объему, дизайну и продолжительности исследований могут быть выполнены разработчиками; особенно это касается препаратов для лечения генетических заболеваний [2, 3]. Поэтому разработка, производство, проведение доклинических (ДКИ) и клинических исследований (КИ) препаратов на основе клеток и тканей человека представляют собой процесс значительно более сложный, трудоемкий, долгосрочный и дорогостоящий по сравнению с традиционными лекарственными препаратами (ЛП), а рассмотрение регуляторными органами результатов разработки с целью вывода на рынок таких препаратов всегда основано на персонализированном подходе [4–7]. Одним из механизмов поддержки разработчиков инновационных препаратов со стороны международных регуляторных органов здравоохранения является научное консультирование.

Цель работы — анализ нормативно-правовой базы и опыта научного консультирования зарубежных регуляторных органов в ходе разработки и вывода на фармацевтический рынок препаратов на основе клеток и тканей человека, что может быть использовано в практике консультирования экспертным учреждением разработчиков БМКП.

Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA)

Взаимодействие EMA с разработчиками/спонсорами ЛП осуществляется с 1995 г. В Комитете по ЛП для человека (Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP) EMA создана рабочая группа по научным консультациям (Scientific Advice Working Party, SAWP), единственной задачей которой является предоставление заявителям научных консультаций (Scientific Advice) и поддержки в рамках протокола (Protocol Assistance). SAWP является многопрофильной экспертной группой и включает председателя и 28 членов, среди кото-

рых заместитель председателя, один представитель Комитета по передовой терапии (Committee for Advanced Therapies, CAT), один представитель Комитета по педиатрии (Paediatric Committee) и до 3 представителей Комитета по орфанным лекарственным средствам (Committee for Orphan Medicinal Products). Председатель назначается CHMP на трехлетний срок с возможностью продления в соответствии с руководством 2017 г.¹

На любом этапе разработки спонсор может запросить у EMA рекомендации и указания относительно подходящих методов и исследований для получения достоверной информации о том, насколько эффективен и безопасен ЛП, независимо от того, подходит ли ЛП для централизованной процедуры авторизации или нет. Кроме того, научные рекомендации регуляторного органа служат дополнительной гарантией правильности выбранных направлений исследований по разработке ЛП при дальнейшей оценке заявки на получение разрешения на маркетинговую авторизацию (marketing authorization application, MAA), а также помогают исключить участие пациентов в КИ, которые не могут продемонстрировать доказательств эффективности и (или) безопасности препарата.

Научные консультации и поддержка в рамках протокола полезны разработчикам ЛП в том случае, если:

- разрабатываются инновационные ЛП, для которых отсутствуют требования или они недостаточно детализированы по разработке и проведению ДКИ и КИ в руководствах ЕС или в монографиях Европейской фармакопеи, включая проекты документов и монографии, выпущенные для обеспечения консультирования;
- разработчик решает отклониться от научных рекомендаций в своем плане разработки ЛП;
- разработчик ЛП имеет ограниченные знания о регулировании ЛП, это касается прежде всего академических научных групп или малых и средних предприятий (МСП).

Разработчики ЛП могут запросить научную консультацию или поддержку в рамках протокола как во время разработки ЛП до подачи MAA, так и после авторизации (рис. 1)².

Поддержка в рамках протокола — это особая форма научного консультирования, доступная разработчикам препаратов, отнесенных к орфанным для лечения редких заболеваний, и касающаяся вопросов критериев их авторизации, к которым относятся:

- демонстрация значимой пользы от применения ЛП для конкретного орфанного заболевания;

¹ Guidance for Applicants seeking scientific advice and protocol assistance (EMA/4260/2001 Rev. 10). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/european-medicines-agency-guidance-applicants-seeking-scientific-advice-protocol-assistance_en.pdf

² How scientific advice works. EMA. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-advice-protocol-assistance/how-scientific-advice-works>

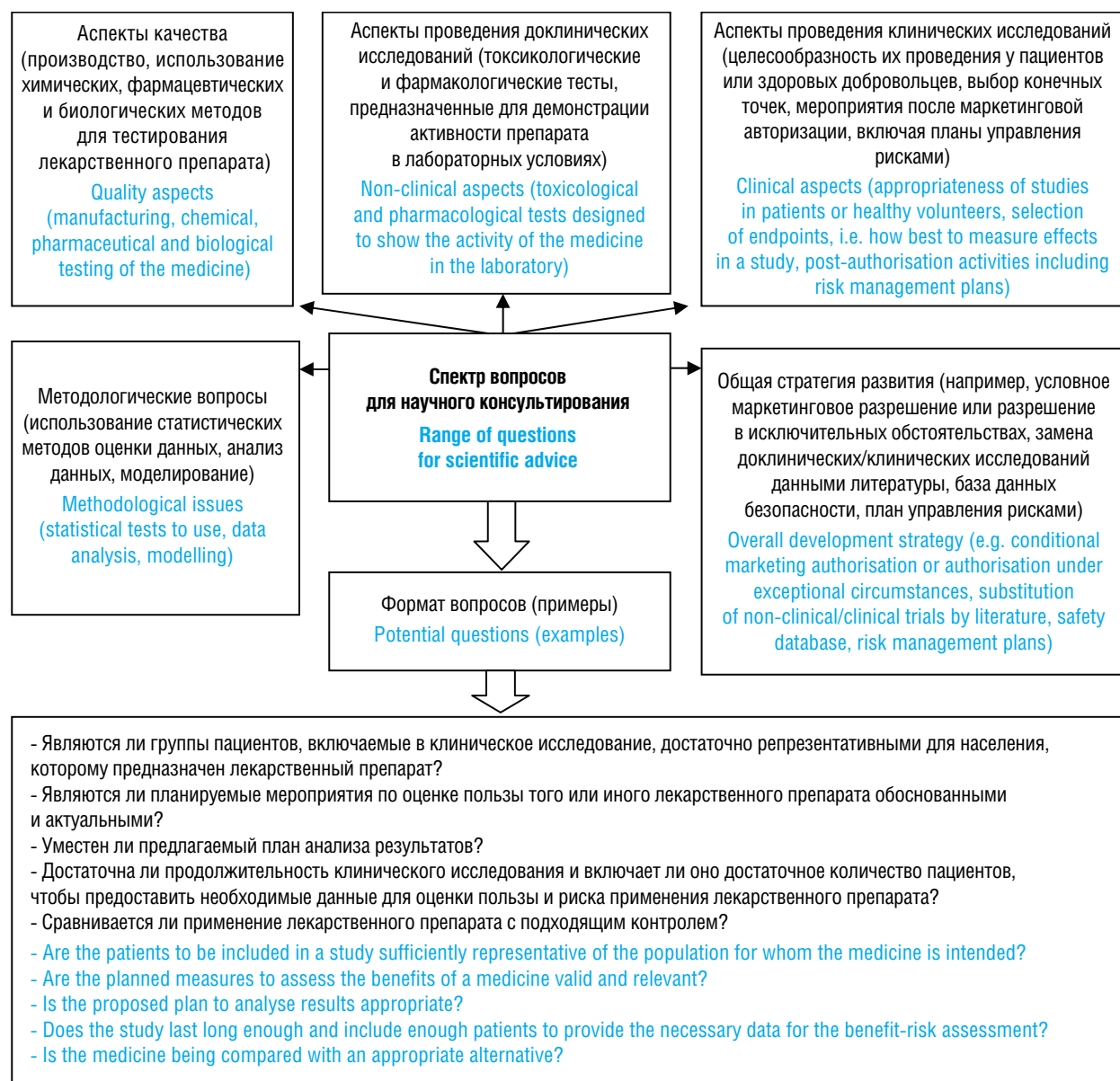


Рис. 1. Спектр вопросов для научного консультирования в Европейском агентстве по лекарственным средствам.
Fig. 1. Types of questions addressed during scientific advice at the European Medicines Agency.

- сходство или клиническое превосходство применения над другими препаратами и (или) методами лечения. Это особенно актуально при наличии на рынке других орфанных ЛП, действие которых аналогично новому продукту для этого же показания.

С 2015 г. возможны научные консультации по изучению безопасности после авторизации (Scientific advice on Post-Authorisation Safety Studies, PASS) по вопросам дизайна долгосрочных пострегистрационных КИ, предназначенных для сбора дополнительной информации о безопасности ЛП после появления его на фармацевтическом рынке³.

Кроме того, начиная с 2006 г. доступна процедура параллельного консультирования EMA с FDA (Parallel Scientific Advice (FDA-EMA), PSA) в соответствии со следующими основными принципами:

- процедура параллельной консультации может быть только однократной;

- запрос PSA не гарантирует, что процедура PSA будет удовлетворена. По ряду причин одно или оба агентства (EMA и FDA) могут отказаться от участия в мероприятии. Если запрос спонсора на параллельную консультацию не будет удовлетворен, то спонсор вправе запрашивать процедуру научного консультирования с каждым агентством индивидуально;

- если оба агентства удовлетворяют запрос PSA, спонсор получит электронное письмо от каждого агентства, подтверждающее такое соглашение, с указанием основного контактного лица в каждом агентстве;

- процесс рассмотрения PSA в целом занимает 70 дней. Теле- или видеоконференция со спонсором и обоими агентствами обычно планируется на 60-й день после получения запроса;

- после процедуры PSA каждое ведомство сохранит свое индивидуальное принятие регуляторных решений, полномочий

³ Guidance for Applicants seeking scientific advice and protocol assistance (EMA/4260/2001 Rev. 10). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/european-medicines-agency-guidance-applicants-seeking-scientific-advice-protocol-assistance_en.pdf

по вопросам разработки ЛП и необходимых документов для маркетинговой авторизации. Рекомендации каждого ведомства могут отличаться после совместного обсуждения⁴.

Также с июля 2017 г. возможны и параллельные консультации ЕМА с Европейской сетью по оценке технологий здравоохранения (European Network for Health Technology Assessment, НТА)⁵, что позволяет разработчикам получать обратную связь от регуляторных органов и органов НТА для поддержки принятия решений на МАА и возможности возмещения затрат на новые ЛП одновременно. Консультации могут проводиться до или после выхода продукта на рынок. Эта процедура заменяет параллельную процедуру научного консультирования органами ЕМА и НТА, при которой разработчики ЛП должны обращаться в органы НТА государств — членов ЕС индивидуально. Оценка НТА затем используется для информирования о возмещении затрат на лечение и цене разрешенного ЛП на национальном уровне⁶.

ЕМА взимает плату за научную консультацию, которая варьирует в зависимости от объема консультации⁷: от 43,70 до 87,60€ (данные на 2019 г.); 75% снижение платы за научное консультирование возможно для ЛП, предназначенных для лечения орфанных заболеваний; 90% снижение пошлин предусмотрено для МСП, причем, если разрабатываемый препарат предназначен для лечения орфанного заболевания или отнесен к механизму приоритетной медицины PRIME (priority medicine), научные консультации проводятся для МСП бесплатно⁸.

Соблюдение научных рекомендаций увеличивает шансы на получение разрешения на маркетинговую авторизацию, но не гарантирует его.

На этапах разработки и оценки подробные рекомендации, данные разработчику ЛП, не публикуются. Однако информация становится доступной по запросу в ЕМА после того, как ЛП получает разрешение на маркетинговую авторизацию. Все отчеты по оценке ЛП, которые были завершены после 1 января 2019 г., включают резюме вопросов разработчика и ключевые элементы рекомендаций ЕМА, а также информацию о том, выполнил ли разработчик эти рекомендации в рамках отчета по оценке. Научные рекомендации также являются одним из основных источников обновления научных рекомендаций ЕМА по развитию медицины и по конкретным заболеваниям⁹.

Процедура научного консультирования включает 2 этапа:

- этап планирования с предварительным совещанием или без него;
- этап оценки без дискуссионного совещания (40 дней) или с дискуссионным совещанием (70 дней).

Заявитель будет проинформирован о точном сроке проведения дискуссионного совещания приблизительно за 10 рабо-

чих дней до проведения. На очное консультирование отводится 90 минут.

Важным является и тот факт, что в процедурах научных консультаций нередко участвуют пациенты. Им предлагается поделиться своим личным опытом в отношении конкретного препарата по определенному показанию. Это может помочь разработчикам ЛП и регуляторным органам понять эффективность исследуемого препарата и разработать оптимальную схему его применения, а также оценить важные аспекты терапии для самого пациента. В 2018 г. каждая пятая процедура научного консультирования включала пациентов, и члены SAWP считали, что почти в 90% случаев участие пациентов обеспечивало дополнительную ценность научного консультирования. Примерно в каждом четвертом случае SAWP рекомендовала изменить план разработки ЛП с учетом рекомендаций пациентов.

Консультирование ЕМА в рамках регистрации препаратов на основе клеток и тканей человека

Консультирование в ЕМА по разработке и регистрации препаратов на основе клеток и тканей человека осуществляет Комитет CHMP.

В ходе разработки препарата Yescarta (axicabtagene ciloleucel, KTE-C19), Kite Pharma, на основе химерных антигенных рецепторов для лечения рефрактерных/рецидивирующих неходжкинских лимфом (НХЛ) заявитель получил четыре научные консультации от ЕМА: 23 июля 2015 г., 17 декабря 2015 г., 23 февраля 2017 г. и 14 сентября 2017 г., которые касались аспектов качества, ДКИ и КИ по следующим вопросам¹⁰.

1. Производственный процесс, определение исходного материала, перечень исследований для выпуска препарата (конечного продукта) и включения в спецификацию, тестирование препарата на наличие репликационно-компетентного ретровируса, стратегия тестирования банков клеток, контроль стерильности, сопоставимость продуктов после изменений процесса производства, программа оценки стабильности и срока годности при хранении, валидация процесса получения ретровирусного вектора.

2. Объем программы ДКИ, учитывая отсутствие соответствующих моделей животных. Оценка инсерционного мутагенеза.

Принимая во внимание тот факт, что препарат Yescarta был ранее рассмотрен FDA и разрешен к медицинскому применению в США, а также то, что по эффективности трансдукции и производственным характеристикам (скорость роста клеток, жизнеспособность, профиль секретируемых факторов) препарат сопоставим с продуктом, разработанным ранее в Национальном институте рака (NCI, США), в ходе консультации было решено, что доклинические данные, полученные с помощью

⁴ Там же.

⁵ Parallel consultation with regulators and health technology assessment bodies. EMA. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-advice-protocol-assistance/parallel-consultation-regulators-health-technology-assessment-bodies>

⁶ Guidance for Parallel Consultation (EMA/410962/2017 Rev.2). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/guidance-parallel-consultation_en.pdf

⁷ Fees payable to the European Medicines Agency. EMA. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/fees-payable-european-medicines-agency>

Explanatory note on general fees payable to the European Medicines Agency (EMA/909567/2019). EMA. https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/explanatory-note-general-fees-payable-european-medicines-agency-1-april-2019_en.pdf

⁸ User guide for micro, small and medium-sized enterprises. EMA. https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/user-guide-micro-small-medium-sized-enterprises_en.pdf

⁹ Guidance for Applicants seeking scientific advice and protocol assistance (EMA/4260/2001 Rev. 10). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/european-medicines-agency-guidance-applicants-seeking-scientific-advice-protocol-assistance_en.pdf

How scientific advice works. EMA. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-advice-protocol-assistance/how-scientific-advice-works>

¹⁰ Assessment report. Yescarta (EMA/CHMP/481168/2018). EMA; 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/yescarta-epar-public-assessment-report_en.pdf

CD19 CAR (chimeric antigen receptor) Т-клеток, изготовленных в NCI, не должны повторяться производителем Kite Pharma при условии доказательства сопоставимости продуктов и процессов производства.

Отсутствие исследований канцерогенности и генотоксичности препарата Yescarta при проведении ДКИ в ходе консультации было признано приемлемым, несмотря на существующий возможный риск трансформации, индуцированной интеграцией γ-ретровирусных векторов в геном Т-клеток. Кроме того, не было зарегистрировано случаев инсерционного онкогенеза в клинической практике как самого препарата, так и Т-клеток, трансдуцированных γ-ретровирусными векторами, кодирующими другие трансгены. Опыт, накопленный до сих пор с мышиными и человеческими Т-клетками, показывает, что трансформация Т-клеток вследствие геномной интеграции γ-ретровирусных векторов является очень редким событием.

3. Открытое неконтролируемое КИ I/II фазы препарата Yescarta: определение целевой популяции (для разных типов НХЛ) и наличие необеспеченной медицинской потребности (unmet medical needs) по заболеванию. Кроме того, рассматривались следующие вопросы: считаются ли частота и продолжительность ответа клинически значимыми по сравнению с историческим контролем; статистическая оценка в разных когортах агрессивных В-клеточных НХЛ; предполагаемый уровень безопасности применения препарата на основе результатов клинической программы.

4. Рандомизированное открытое основное КИ фазы III при сравнении со стандартной терапией: выбор популяции для КИ препарата Yescarta (по показанию рецидивирующая/рефрактерная диффузная В-крупноклеточная лимфома, ДВККЛ) и определение количества пациентов. Выживаемость как конечная точка, ее определение, целесообразность для демонстрации клинического преимущества в ходе второй линии терапии ДВККЛ. Ключевые вторичные конечные точки (объективная частота ответов и общая выживаемость). Репрезентативность для европейских пациентов со стандартным лечением в контрольной группе. Методика и частота визуализации и оценки опухоли. План статистического анализа для первичных и вторичных точек, включая промежуточный анализ. Сообщение о серьезных нежелательных явлениях. План мониторинга предполагаемой безопасности, включающий оценку появления репликационно-компетентного ретровируса, определение уровней цитокинов и иммуногенности [1].

При взаимодействии разработчика препарата Kymriah (tisagenlecleucel), Novartis, на основе химерных антигенных рецепторов для лечения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) и диффузной В-крупноклеточной лимфомы с ЕМА было проведено 4 консультации, включая поддержку в рамках протокола: 25 апреля 2014 г., 28 апреля 2016 г., 20 июля и 14 сентября 2017 г. Консультации касались аспектов качества, ДКИ и КИ (в нормативной документации детализация содержания консультации не представлена)¹¹.

В ходе разработки препарата Strimvelis (GSK2696273), GSK¹², для лечения генетического заболевания — тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с дефектом гена аденозиндеаминазы, заявитель получил пять научных консультаций от CHMP: 21 июня 2007 г., 25 сентября 2008 г.,

23 июня 2011 г., 20 февраля и 11 марта 2014 г. Рекомендации касались аспектов качества, ДКИ и КИ. В частности, в ходе научных консультаций было решено следующее.

1. Оценка риска опухолевого процесса для препарата может быть основана на клинических данных и по данным литературы для аналогичных векторов, если исследования общей токсичности не выявили образования опухоли из клеток.

2. Было признано приемлемым, что ДКИ туморогенности нецелесообразно, поскольку невозможно продемонстрировать длительное приживание трансдуцированных клеток у мышей.

3. ДКИ канцерогенности препарата Strimvelis не проводились из-за отсутствия адекватной модели животных, что приемлемо в связи с отсутствием проявления опухолевой трансформации клеток в КИ. Однако в соответствии с планом управления рисками вероятность образования опухоли будет оцениваться в ходе длительного наблюдения за КИ AD1115611 и с помощью реестра пациентов.

При разработке препарата Zynteglo (bluebird bio), предназначенного для лечения другого генетического заболевания — β-талассемии, заявитель получил 5 научных консультаций по разработке препарата, включая поддержку в рамках протокола: 25 апреля и 23 июля 2015 г., 16 сентября 2016 г., 21 апреля и 9 ноября 2017 г.¹³ Поддержка в рамках протокола касалась следующих аспектов качества: производственный процесс и его влияние на результаты КИ, в частности, при изменении площадки производства и совершенствовании производственного процесса; надежность характеристик препарата и аналитических методов при выпуске, его стабильность; состав спецификации на препарат, предназначенный для КИ; передача (трансфер) технологии; состав досье для заявки на получение разрешения на маркетинговую авторизацию, сроки представления данных, квалификация центров для проведения афереза и прослеживаемость материала для производства и продукта.

В ходе разработки препарата Zynteglo было описано несколько вариантов производственного процесса и соответствующих продуктов (HGB-205, HGB-204, HGB-207 и 212). Предлагаемые производственные изменения и шаги для обеспечения репрезентативности выборки при анализе партий продукта, произведенного ранее, с продуктом, произведенным после совершенствования технологического процесса, обсуждались в ходе четырех консультаций до подачи заявки на получение разрешения на маркетинговую авторизацию. SAWP было признано, что результаты исследований достаточно наглядно демонстрируют, что технологические процессы производства и партии продукта сопоставимы. Наблюдаемые различия производственного процесса могут быть приемлемыми с точки зрения безопасности и эффективности. Неопределенность была надлежащим образом устранена заявителем в ответ на запрос.

Поддержка в рамках протокола касалась следующих перечисленных аспектов КИ препарата Zynteglo в контексте двух параллельных консультаций ЕМА и рекомендаций по оценке технологий (НТА).

1. Пригодность данных, полученных в ходе КИ при усовершенствовании производственного процесса для поддержки МАА, включая количество пациентов, получивших препарат, и их генотип.

¹¹ Assessment report. Kymriah (EMA/485563/2018). EMA; 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/kymriah-epar-public-assessment-report_en.pdf

¹² Assessment report. Strimvelis (EMA/CHMP/272303/2016). EMA; 2016. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/strimvelis-epar-public-assessment-report_en.pdf

¹³ Assessment report. Zynteglo (EMA/56140/2020). EMA; 2019. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zynteglo-epar-public-assessment-report_en.pdf

2. Адекватность предлагаемых конечных точек.
3. Наиболее ранний момент времени для получения данных об эффективности и безопасности в поддержку получения условного разрешения на продажу.
4. Планы статистического анализа.
5. Экстраполяционные модели для прогнозирования долгосрочной эффективности, а также для включения детей в КИ.
6. Дизайн подтверждающих КИ и практический мониторинг для проведения долгосрочных исследований эффективности и безопасности.
7. Предлагаемые планы фармаконадзора и минимизации рисков.

Для препарата Zalmoxis, MolMed SpA, предназначенного для восстановления иммунной системы пациентов с лейкемией после трансплантации костного мозга, было проведено 5 научных консультаций: 19 ноября 2004 г., 7 февраля 2007 г., 22 октября 2009 г., 7 января и 17 ноября 2011 г. Рекомендации касались аспектов качества, ДКИ и КИ. В частности, при обсуждении программы ДКИ было признано приемлемым совмещение ДКИ по доказательству концепции и токсикологических исследований. Кроме того, объектом согласования в ходе консультаций был тот факт, что ДКИ *in vitro* и *in vivo* на иммунодефицитных мышях проводили с использованием генетически модифицированных клеток как на основе ретровирусного вектора SFCMM-3#35, так и оптимизированного варианта вектора, кодирующего мутантную форму гена HSV-TK herpes simplex I virus thymidine kinase (HSV-TK Mut2), а также оптимизация всего процесса производства до начала фазы III КИ¹⁴.

Взаимодействие разработчика препарата Holoclar, Holostem Therapie Avanzate S.R.L, для лечения поражений роговицы, связанных с недостатком лимбальных стволовых клеток, включало 4 консультации: 25 июня и 25 сентября 2009 г., 23 июня и 5 сентября 2011 г.¹⁵ Поддержка в рамках протокола касалась аспектов качества, доклинических и клинических исследований. В частности, в ходе разработки препарата была осуществлена замена некоторых видов сырья: переход от необлученных к гамма-облученным сывороткам крупного рогатого скота и введение реагентов более высокого класса чистоты, как это было предложено в ходе оказания поддержки в рамках протокола.

Кроме того, в ходе консультаций представителями SAWP было выдвинуто одно серьезное возражение в отношении клеток мышей 3Т3, используемых в качестве фидерных при производстве препарата Holoclar, поскольку было недостаточно продемонстрировано отсутствие пролиферации мышинной клеточной линии после облучения. Заявителю было предложено использовать валидированную методику для демонстрации отсутствия пролиферации клеток 3Т3 после облучения. Эта проблема была в достаточной степени решена путем валидации методики облучения, а отсутствие пролиферации облученных клеток было подтверждено несколькими способами.

В целом, что касается производства, характеристики и контроля качества, идентичности, активности, чистоты, примесей препарата Holoclar, в ходе научного консультирования были рассмотрены другие замечания, которые были в достаточной мере учтены заявителем.

При разработке препарата Alofisel, Takeda Pharma A/S, на основе мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) для лечения свищей при болезни Крона, заявитель получил 4 консультации (поддержка в рамках протокола) в 2005, 2006, 2009 и в 2011 г., которые касались качества, доклинических и клинических аспектов изучения препарата¹⁶. В ходе первых трех консультаций рассматривались аспекты качества и применение аутологичных МСК ЖТ, рекомендации 2011 г. касались уже применения аллогенных МСК ЖТ, рекомендации по качеству аллогенных МСК ЖТ были экстраполированы с ранних консультаций для аутологичных МСК ЖТ. Кроме того, были определены критические стадии производства.

В ходе ДКИ по подтверждению концепции модель анальных свищей у животных не использовалась. Это было согласовано в ходе научной консультации 2011 г., вместо этого была использована экспериментальная модель колита для оценки влияния МСК ЖТ на воспаление в кишечнике.

Также в ходе консультаций обсуждалось определение первичной конечной точки КИ препарата Alofisel: CHMP прокомментировал, что первичная конечная точка в основном КИ фазы III должна определяться в соответствии с руководством¹⁷, т.е. «полное закрытие свищей без образования новых свищей». Считалось, что оптимальная конечная точка для демонстрации ремиссии на 24 неделе будет сочетанием полного заживления (отсутствие выделений после легкого нажатия) с полным закрытием свищей на основе данных MPT. В основном КИ первичная конечная точка эффективности не соответствует этой рекомендации и соответствует определению: «клиническое закрытие свищей более 2 см, которые были дренированы в основном, при легком нажатии — отсутствие выделений», подтвержденное MPT-изображениями, на 24 неделе.

В ходе разработки препарата Spherox, Co.don AG, на основе хондроцитов для лечения остеохондральных поражений коленного сустава, заявитель получил 2 научные консультации в январе и сентябре 2009 г. Рекомендации касались аспектов качества, ДКИ и КИ¹⁸. В ходе второй консультации было заявлено, что дизайн КИ в значительной степени согласуется с ранее предоставленными научными рекомендациями, в том числе по выбору активного компаратора в КИ фазы III. Однако заявителю было рекомендовано продемонстрировать зависимость дозы-ответа в КИ фазы II, учитывая отсутствие соответствующего контроля для КИ при площади поражения хряща более 4 см², несмотря на то, что это было осложнено узким диапазоном доз, выбранных для данного исследования.

Взаимодействие Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (FDA, США) с разработчиками/спонсорами лекарственных препаратов

В соответствии с национальной процедурой регистрации ЛП в США первоначально подается заявка на исследование применения нового препарата (investigational new drug, IND), результаты рассмотрения которой показывают клиническую значимость нового продукта, основанные на данных о качестве

¹⁴ EPAR summary for the public. Zalmoxis (EMA/454627/2016). EMA; 2016. https://www.ema.europa.eu/documents/overview/zalmoxis-epar-summary-public_en.pdf

¹⁵ Summary of product characteristics. Holoclar (EMA/6865/2015). EMA; 2015. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002450/WC500183404.pdf

¹⁶ Assessment report. Alofisel (darvadstrocel) (EMA/CHMP/64055/2018). EMA; 2017. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/alofisel-epar-public-assessment-report_en.pdf

¹⁷ Guideline on the development of new medicinal products for the treatment of Crohn's Disease (CHMP/EWP/2284/99 Rev. 2). EMA; 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-development-new-medicinal-products-treatment-crohns-disease-revision-2_en.pdf

¹⁸ Summary of product characteristics. Spherox. https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/spherox-epar-product-information_en.pdf

и ДКИ. Период времени IND — это промежуток времени, в течение которого ведется исследование нового препарата на человеческой популяции. С точки зрения FDA, фаза подачи заявки IND разработки ЛП охватывает период времени от первой заявки на разработку нового препарата (включая предварительные консультации, первичные консультации для биоаналогов или собственно подачу заявки) до подачи заявки на маркетинг. Со стороны разработчика или спонсора фаза подачи заявки IND может включать также КИ в других странах. Кроме того, при внесении нового показания применения препарата подается заявка NDA (new drug application, новое применение препарата). Для вывода препарата на рынок необходимо лицензирование препарата (biologics license applications, BLA). Заявка BLA рассматривается от 10 до 12 месяцев с момента подачи¹⁹.

Консультирование FDA осуществляется в соответствии с руководством для отрасли 2009 г.²⁰ Данное руководство содержит рекомендации для промышленности по проведению официальных встреч (консультаций) между FDA и заявителями (спонсорами), имеющими отношение к разработке ЛП, в том числе биологических (далее продукты), регулируемых Центром экспертизы и исследования лекарственных средств (Center for Drug Evaluation and Research, CDER) и Центром экспертизы и исследования биологических препаратов (Center for Biologics Evaluation and Research, CBER).

В 2017 г. был выпущен проект руководства²¹, уточняющий предыдущее.

Консультации могут осуществляться в следующих форматах:

- очная встреча (face to face);
- телеконференция;
- видеоконференция;
- письменная консультация (written response only).

В соответствии с проектом руководства²¹, существует четыре типа официальных встреч (консультаций), которые происходят между заявителями и FDA: тип А, тип В, тип В (end of phase, EOP) и тип С.

Встречи типа А — это консультации, которые необходимы для продолжения разработки продукта, выбора программы новых направлений КИ или решения важной проблемы безопасности. Примеры встреч типа А включают:

- заседания по разрешению споров (в соответствии с 21 CFR 10.75, 312.48 и 314.103²² и руководством²³);
- обсуждение нового направления исследования препарата;
- встречи, которые запрашиваются после получения оценки специального протокола FDA;
- консультации, запрошенные в течение 3 месяцев после принятия другого регламентационного постановления FDA;
- встречи, запрошенные в течение 30 дней с момента выдачи FDA письма об отказе в подаче заявки на исследование нового ЛП (21 CFR 88.314.101(a) (3)²²).

Совещания типа В проводятся в следующих случаях:

- встречи по рассмотрению проведенных предварительных исследований применения новых лекарственных средств (pre-IND);
- консультации по разрешению использования препарата в экстренных случаях;
- предварительные встречи для подачи заявки на применение нового препарата / на регистрацию нового препарата (pre-NDA/pre-BLA) (21 CFR 312.47)²⁴;
- консультации, запрошенные через 3 или более месяцев после принятия другого регламентационного постановления FDA;
- встречи, посвященные стратегии оценки рисков и смягчения их последствий или требованиям к пострегистрационным исследованиям, которые проводятся вне контекста рассмотрения заявки на маркетинговую авторизацию;
- встречи по обсуждению общей программы развития продуктов для присвоения статуса прорывной терапии (breakthrough therapy designation). Последующие встречи по назначенным продуктам прорывной терапии будут рассматриваться либо как встречи типа В, либо, возможно, как встречи типа А, если запрос на консультацию соответствует критериям для встречи типа А.

Как правило, FDA предоставляется по одной консультации типа В перед подачей заявки IND, заявки NDA или заявки BLA. Исключением являются препараты, получившие статус прорывной терапии, количество консультаций может быть больше.

К консультациям типа В (end-of-phase, EOP) относятся:

- определенные встречи в конце фазы I КИ (например, для продуктов, которые будут рассматриваться для регистрации в соответствии с 21 CFR часть 312, подраздел Е, или 21 CFR часть 314, подраздел Н, или аналогичные продукты²⁵);
- встречи в конце фазы II или перед фазой III КИ (21 CFR 312.47²⁶).

Консультации типа С посвящены разработке и обзору продукта, включая совещания для содействия ранним консультациям по использованию биомаркера в качестве новой суррогатной конечной точки, которая ранее никогда не использовалась в качестве основной для утверждения продукта по данному показанию.

Сроки принятия решения о проведении консультаций, предоставления пакета документов определяются типом консультаций (табл. 1)²⁷.

Запрос о проведении консультации может быть отклонен, например, потому что ее проведение является преждевременным на данном этапе разработки продукта или представленный пакет документов не обеспечивает возможность обсуждения поставленных вопросов.

¹⁹ Best Practices for Communication Between IND Sponsors and FDA During Drug Development Guidance for Industry and Review Staff Good Review Practice. FDA; 2017. <https://www.fda.gov/media/94850/download>

²⁰ Guidance for Industry Formal Meetings Between the FDA and Sponsors or Applicants. FDA; 2009. <https://www.fda.gov/media/72253/download>

²¹ Formal Meetings Between the FDA and Sponsors or Applicants of PDUFA Products Guidance for Industry (Draft). FDA; 2017. <https://www.fda.gov/media/109951/download>

²² Code of Federal Regulations Title 21. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/cfrsearch.cfm>

²³ Formal Dispute Resolution: Sponsor Appeals Above the Division Level. Guidance for Industry and Review Staff. <https://www.fda.gov/media/126910/download>

²⁴ Code of Federal Regulations. 21 CFR 312.47 Meetings. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=312.47>

²⁵ Code of Federal Regulations. 21 CFR.312 Investigational new drug application. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?CFRPart=312>

Code of Federal Regulations. 21 CFR.314 Applications for FDA approval to market a new drug. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?CFRPart=314>

²⁶ Code of Federal Regulations. 21 CFR 312.47. Meetings. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=312.47>

²⁷ Formal Meetings Between the FDA and Sponsors or Applicants of PDUFA Products Guidance for Industry (Draft). FDA; 2017. <https://www.fda.gov/media/109951/download>

Таблица 1. Типы консультаций при взаимодействии FDA с заявителями/спонсорами²⁸
Table 1. Types of FDA meetings with applicants/sponsors²⁸

Описание процедуры Description of the procedure	Тип консультации Type of meeting			
	A	B	B (EOP)	C
Срок ответа на запрос о проведении/непроведении встречи (календарные дни с момента поступления запроса) Response timelines for meeting requests/meeting cancellation requests (calendar days from receipt of the request)	14	21	14	21
Предоставление пакета документов для проведения консультации Requester meeting package timelines	В момент подачи запроса At the time of the meeting request	Не позднее чем за 30 дней до проведения консультации No later than 30 days before the scheduled date of the meeting	Не позднее чем за 50 дней до проведения консультации No later than 50 days before the scheduled date of the meeting	Не позднее чем за 47 дней до проведения консультации ^a No later than 47 days before the scheduled date of the meeting ^a
Предварительные ответы FDA на запросы (если применимо) Preliminary FDA responses to requests (if applicable)	Не позднее чем за 2 дня до проведения консультации No later than 2 days before the scheduled date of the meeting		Не позднее чем за 5 дней до проведения консультации No later than 5 days before the scheduled date of the meeting	
Срок предоставления консультации (календарные дни с момента поступления запроса) Meeting scheduling time frames (calendar days from receipt of the meeting request)	30	60	70	75
Предоставление протокола (если применимо) Provision of the meeting minutes (if applicable)	30 дней после консультации within 30 calendar days after the meeting			

^a Для совещаний типа C, которые запрашиваются в качестве ранних консультаций по использованию новой суррогатной конечной точки, которая будет использоваться в качестве основной для утверждения препарата по данному показанию, пакет документов должен быть представлен во время запроса на проведение консультации.

^a For Type C meetings that are requested as early consultations on the use of a new surrogate endpoint to be used as the primary basis for product approval in a proposed context of use, the meeting package is due at the time of the meeting request.

Причинами изменения дат встреч (сроков проведения консультации в соответствии с таблицей 1) могут быть:

- информация из представленного пакета документов недостаточна для проведения консультации и требуются дополнительные сведения;
- недостаточно времени для рассмотрения представленных материалов;
- задержка в предоставлении документов заявителем/спонсором;
- в случаях, когда требуется присутствие других подразделений FDA (не CDER или CBER), например юристов, но первоначально этого не было отражено в запросе на консультацию.

Консультация (встреча) может быть отменена в следующих случаях:

- пакет документов не представлен в сроки, указанные в таблице 1, или его содержание не позволяет провести консультацию по поставленным вопросам;
- если заявитель удовлетворен предварительным ответом CBER, он может запросить отмены очной встречи, однако она может быть отменена на усмотрение CBER, так как иногда вопросы остаются у регуляторного органа (например, связанные с определением дозы, популяции пациентов, с особым рассмотрением безопасности).

Консультирование FDA в рамках регистрации препаратов на основе жизнеспособных клеток человека

При рассмотрении заявки на препарат Kymriah (tisagenlecleucel), Novartis, на регистрацию BLA (была подана в феврале 2017 г. и установлено рассмотрение материалов в течение 8 месяцев — ускоренное в связи с присвоенным статусом препарата прорывной терапии) по показанию ОЛЛ, заседание Консультативного комитета по онкологическим препаратам (Oncology Drugs Advisory Committee, ODAC) состоялось 12 июля 2017 г. для предоставления рекомендаций FDA относительно качества и безопасности продукции, клинической безопасности и в целом оценки рисков и пользы применения Kymriah, были приняты следующие решения²⁹.

1. Комитет ODAC согласился с тем, что меры по снижению риска, предусмотренные в КИ B2202 (Eliana³⁰), были достаточными. Также было признано, что инсерционный мутагенез является потенциальным риском применения препарата, однако озабоченности по поводу отсутствия результатов тестирования на предмет появления репликационно-компетентного ретровируса выражено не было.

2. Комитет ODAC одобрил 15-летний срок запланированных пострегистрационных КИ B2401.

²⁸ Там же.

²⁹ Summary Basis for Regulatory Action. Kymriah. <https://www.fda.gov/media/107962/download>

³⁰ <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02435849?term=NCT02435849&draw=2&rank=1>

3. Профиль отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения препарата был признан приемлемым (10 из 10 членов ODAC проголосовали положительно).

Переговоры между FDA и заявителем относительно продолжительности ответа, необходимого для установления эффективности препарата Kymriah для лечения ДВКЛ, проходили в виде нескольких телекоммуникационных консультаций³¹: на предварительном заседании по рассмотрению заявки BLA 4 августа 2017 г. заявитель предложил провести оценку эффективности на основе промежуточного анализа данных 81 пациента на 8 марта 2017 г. Используя этот график, заявитель сможет представить полный 3-месячный ответ и последующие данные по всем пациентам (81), но только 46 из них завершили бы 6-месячное наблюдение. Рецензенты КИ FDA указали, что такой продолжительности последующих мероприятий будет недостаточно для демонстрации долгосрочного эффекта, после чего заявитель предложил дополнить их первоначальное представление 30-дневным сроком действия и обновленными данными безопасности (с датой анализа данных на 6 сентября 2017 г.) и окончательным обновлением данных по безопасности на 120-й день для 92 пациентов. Этот график предусматривает 9-месячные оценки для всех пациентов из КИ.

При взаимодействии с FDA по препарату Yescarta (axicabtagene ciloleucel, KTE-C19), Kite Pharma, в октябре 2016 г. перед подачей заявки на регистрацию была проведена консультация типа В, в ходе которой эксперты FDA указали о преждевременности предоставления заявки BLA, так как период наблюдения за пациентами в КИ ZUMA-1³² составлял менее 6 месяцев, а также количество пациентов было меньше, чем предварительно определенное количество испытуемых в первичном анализе³³. FDA запросило данные о продолжительности ответа после 6 месяцев наблюдения для всех пациентов, получивших препарат. FDA согласилось на поэтапное предоставление данных: первый модуль был представлен 2 декабря 2016 г., а заключительные модули — 31 марта 2017 г. После подачи заявки BLA телеконференция была проведена 31 мая 2017 г. по вопросу адекватного наблюдения за эффективностью применения препарата в клинической практике.

Летом 2020 г. FDA был разрешен к медицинскому применению третий в мире препарат на основе химерных антигенных рецепторов — Tecartus (brexucabtagene autoleucel, Kite Pharma), предназначенный для лечения взрослых пациентов с рецидивирующей/рефрактерной мантийноклеточной лимфомой. Учитывая, что препарат Tecartus аналогичен ранее одобренному препарату Yescarta, вопросов по выводу его на рынок у заявителя не возникло. Однако были проведены две встречи типа В: в апреле 2019 г. обсуждался формат и содержание BLA, а в ноябре 2019 г. состоялось предварительное совещание непосредственно перед подачей заявки на маркетинг BLA³⁴.

Очная консультация при регистрации препарата Gintuit (Organogenesis Inc.) на основе кератиноцитов и фибробластов для восстановления слизистой оболочки полости рта была проведена FDA 17 ноября 2011 г.³⁵ Обсуждаемые темы включали сопоставимость банков клеток, активность продукта,

клиническую эффективность и безопасность Gintuit, а также отчет, описывающий показания и предполагаемую популяцию пациентов.

1. Было отмечено, что заявитель не представил никаких данных, подтверждающих эквивалентность между банками клеток, поэтому и отсутствует корреляция между несколькими клеточными банками и активностью материала. Было рекомендовано расширить перечень определяемых биологических характеристик (например, количество экспрессируемых цитокинов) для поддержания эквивалентной активности продуктов из разных партий.

2. В ходе консультации было сделано заключение о недостаточности проведения гистологического анализа препарата для подтверждения активности. Гистологический анализ подходит для демонстрации структурной целостности продукта, но не подтверждает его биологическую активность. Было рекомендовано для определения активности включить исследование по определению уровней продукции цитокинов.

3. Клинические аспекты включали клиническую эффективность, показания к применению, популяцию пациентов и безопасность препарата Gintuit для применения в стоматологии. Члены консультационной группы согласились с тем, что данный продукт является эффективным, поскольку он удовлетворяет следующим требованиям: первичная точка эффективности — уменьшение зоны ороговения тканей, а также вторичные конечные точки, включая подбор цвета, подбор текстуры, предпочтения пациента и отсутствие ороговевшей ткани размером более 1 мм.

Что касается безопасности препарата Gintuit, то некоторые члены консультационной группы полагали, что могут возникнуть вопросы, связанные с возможными воспалительными и иммунными реакциями, а также существует риск развития опухоли в полости рта. Поэтому было рекомендовано наблюдение за пациентами в течение более чем 6 месяцев для оценки риска развития воспаления и онкогенеза.

4. Дополнительно обсуждались клинические аспекты относительно подходящей популяции пациентов. Некоторые члены комитета заявили, что продукт после регистрации может быть использован у детей и рекомендовали препарат для проведения КИ у детей с последующим наблюдением за безопасностью более 6 месяцев.

Научное консультирование экспертным учреждением по вопросам разработки, проведения доклинических и клинических исследований инновационных препаратов для медицинского применения в Российской Федерации

В Российской Федерации новым является механизм консультирования экспертным учреждением по вопросам государственной регистрации, проведения ДКИ, КИ, биомедицинской экспертизы БМКП. Для лекарственных средств в национальном законодательстве подобного механизма не существовало и стало возможным только с появлением законодательства Евразийского экономического союза (ЕАЭС).

³¹ Summary Basis for Regulatory Action Template. Kymriah. <https://www.fda.gov/media/113215/download>

³² <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02348216?term=Zuma+1&draw=2&rank=1>

³³ Summary Basis for Regulatory Action. Yescarta. <https://www.fda.gov/media/108788/download>

³⁴ Summary Basis for Regulatory Action. Tecartus. <https://www.fda.gov/media/141093/download>

³⁵ Summary Basis for Regulatory Action. Gintuit. <http://wayback.archive-it.org/7993/20170723023240/https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM297753.pdf>

В рамках ЕАЭС согласно статье 26 Решения № 78³⁶ уполномоченные органы или экспертные организации государств-членов вправе по запросу заявителя проводить научные и предрегистрационные консультации в соответствии с законодательством государств-членов. Консультации проводятся до подачи заявления на регистрацию ЛП по вопросам, связанным с проведением аналитических испытаний, ДКИ и КИ, аспектам процедуры регистрации, формата подачи заявления и регистрационного досье, по вопросам предоставления образцов ЛП, стандартных образцов и других материалов, необходимых для проведения лабораторной экспертизы качества, и по другим вопросам. В настоящее время отдельного нормативно-правового акта ЕАЭС по механизму консультирования пока не принято.

Национальным законодательством в области БМКП (180-ФЗ)³⁷ предусмотрена возможность взаимодействия заявителя с Минздравом России и экспертным учреждением по вопросам государственной регистрации БМКП. Приказ Минздрава России от 28.02.2017 № 80н³⁸ о порядке дачи разъяснений положений документации предполагает разъяснение положений 180-ФЗ, постановлений Правительства и нормативно-правовых актов, обеспечивающих реализацию 180-ФЗ через обращение в Минздрав России.

Возможно проведение консультирования экспертным учреждением по вопросам государственной регистрации, биомедицинской экспертизы, проведения ДКИ и КИ БМКП³⁹, в том числе и очных консультаций⁴⁰.

Порядок консультирования следующий:

- обращение осуществляется через официальный письменный запрос на консультирование в экспертное учреждение на имя генерального директора;
- запрос рассматривается и направляется ответ в течение не более 10 рабочих дней;
- необходимо обратить внимание, что очное консультирование может осуществляться только после письменного ответа экспертного учреждения при повторном запросе (на очное консультирование) заявителя. После получения такого запроса происходит согласование между экспертным учреждением и заявителем даты проведения очного консультирования. Консультирование проводится на базе экспертного учреждения и фиксируется посредством аудио- или видеозаписи⁴¹;
- информация о содержании запросов ежеквартально размещается на официальном сайте экспертного учреждения с соблюдением ограничений, установленных законодательством Российской Федерации о персональных данных, коммерческой, государственной и иной охраняемой законом тайне.

За 2 года (2018–2020 гг.) в экспертное учреждение поступило 18 запросов о консультировании (8 через профильный Департамент Минздрава России), проведено 9 письменных консультаций и 1 очная.

Все запросы касались экспертизы, проведения ДКИ и КИ конкретных типов БМКП, в частности: состава документов

для проведения биомедицинской экспертизы, рекомендаций для написания нормативной документации на БМКП, экспертизы качества в месте производства, проведения исследований специфического действия, выбора моделей животных для токсикологических исследований, продолжительности исследований онкогенности, выбора способов введения, объема международных многоцентровых КИ. В настоящее время наиболее часто задаваемые вопросы с ответами экспертного учреждения размещены на официальном сайте экспертного учреждения⁴⁰.

Заключение

Таким образом, практика консультирования ЕМА и FDA за последние 20 лет показывает, что наибольшее количество консультаций (в среднем 4–6) было проведено для препаратов на основе жизнеспособных клеток человека, предназначенных для лечения заболеваний (генетических, онкологических), содержащих генетически модифицированные клетки, и отнесенных к необеспеченным медицинским потребностям (в том числе в США — препаратов, имеющих статус препаратов прорывной терапии, в ЕС — препаратов, имеющих статус PRIME). Наиболее часто рассматриваемые вопросы преимущественно касались состава спецификации на готовый препарат, объема ДКИ, различных аспектов оценки эффективности и безопасности препаратов, количества пациентов, конечных точек эффективности в КИ (часто — продолжительности наблюдения), оценки появления репликационно-компетентных ретровирусов. Кроме того, необходимо отметить, что в США консультирование преимущественно проводилось уже в период рассмотрения заявки на регистрацию, тогда как в ЕС консультации проходили с ранних этапов разработки и перерывы между ними для одного препарата могли составлять до нескольких лет.

Регламентируемые национальными нормативными актами процедуры консультирования похожи в ЕМА и FDA. Значительные преференции по оплате консультаций предоставляются в ЕМА: если разрабатываемому препарату присвоен статус PRIME или он предназначен для лечения орфанного заболевания, то для заявителя консультации проводятся с 75% скидкой, также имеются льготы по оплате для МСП.

В России для экспертного учреждения механизм научного консультирования в области БМКП и по правилам ЕАЭС является новым, что объясняет отсутствие опыта его проведения, сравнимого с опытом регуляторных органов ЕС и США. Необходимо обратить внимание, что срок предоставления консультаций по национальной процедуре для БМКП значительно меньше по сравнению с таковым ЕМА и FDA.

Изученный опыт научного консультирования ЕМА и FDA (в том числе применительно к разрешенным к медицинскому применению препаратам на основе клеток и тканей человека — аналогов БМКП) может быть использован в России в практике консультирования экспертного учреждения.

³⁶ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

³⁷ Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

³⁸ Приказ Минздрава России от 28.02.2017 № 80н «Об утверждении Порядка дачи разъяснений положений документации, связанной с государственной регистрацией, а также с доклиническими и клиническими исследованиями биомедицинских клеточных продуктов».

³⁹ Приказ Минздрава России от 23.08.2017 № 542н «Об утверждении Порядка консультирования по вопросам, связанным с проведением доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов, клинических исследований биомедицинских клеточных продуктов, биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов, государственной регистрации биомедицинских клеточных продуктов».

⁴⁰ Приказ Минздрава России от 07.12.2018 № 855н «О внесении изменений в порядок консультирования по вопросам, связанным с проведением доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов, клинических исследований биомедицинских клеточных продуктов, биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов, государственной регистрации биомедицинских клеточных продуктов, утвержденный приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23 августа 2017 г. № 542н».

⁴¹ https://www.regmed.ru/content/page/EXPERTISE_BCP_FAQS

Вклад авторов. *Е. В. Мельникова* — идея, концепция и дизайн исследования, анализ и обобщение результатов исследования по научным консультациям, проводимым ЕМА и FDA, по зарегистрированным за рубежом препаратам на основе жизнеспособных клеток человека; *О. В. Меркулова* — анализ и обобщение данных, изложенных в нормативных документах Российской Федерации, написание, доработка текста; *В. А. Меркулов* — интерпретация результатов исследования, окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. *Ekaterina V. Melnikova*—elaboration of the study idea, concept, and design, analysis and preparation of the summary of the study results on scientific advice provided by the EMA and FDA for human viable cell-based products authorised in the foreign markets; *Olga V. Merkulova*—analysis and consolidation of data from Russian regulatory documents, writing and revision of the text; *Vadim A. Merkulov*—interpretation of the study results, final approval of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Конфликт интересов. В. А. Меркулов является главным редактором журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Vadim A. Merkulov is the Editor-in-chief of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, Veraitch FS. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Curr Opin Biotechnol.* 2018;53:164–81. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.025>
2. Ferrua F, Aiuti A. Twenty-five years of gene therapy for ADA-SCID: from bubble babies to an approved drug. *Hum Gene Ther.* 2017;28(11):972–81. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.175>
3. Alessandrini M, Krause K-H, Speck RF, Pepper MS. Transplantation of gene-modified haematopoietic stem cells: application and clinical consideration. *S Afr Med J.* 2019;109(8b):64–9. <https://doi.org/10.7196/SAMJ.2019.v109i8b.013910>
4. Li Y, Huo Y, Yu L, Wang J. Quality control and nonclinical research on CAR-T cell products: general principles and key issues. *Engineering.* 2019;5(1):122–31. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.12.003>
5. Pellegrini G, Ardigò D, Milazzo G, Iotti G, Guatelli P, Pelosi D, et al. Navigating market authorization: the path holoclar took to become the first stem cell product approved in the European Union. *Stem Cells Transl Med.* 2018;7(1):146–54. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0003>
6. Yu TTL, Gupta P, Ronfard V, Vertès AA, Bayon Y. Recent progress in European advanced therapy medicinal products and beyond. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018;21(6):130. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00130>
7. Jeng Ting DS, Peh G, Adnan K, Mehta J. Translational and regulatory challenges of corneal endothelial cell therapy: a global perspective. *Tissue Eng Part B Rev.* 2020; Jan 11. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2020.0319>

Об авторах / Authors

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук. *Ekaterina V. Melnikova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

Меркулова Ольга Владимировна, канд. мед. наук. *Olga V. Merkulova*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7013-0394>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. *Vadim A. Merkulov*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 13.01.2021

После доработки 09.03.2021

Принята к публикации 03.09.2021

Received 13 January 2021

Revised 9 March 2021

Accepted 3 September 2021

Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2

Д. А. Потеряев^{1,*}, С. Г. Аббасова¹, П. Е. Игнатьева¹, О. М. Стрижакова¹, С. В. Колесник², Р. А. Хамитов¹

¹ Общество с ограниченной ответственностью
«Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»,
ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район,
Владимирская область, 601125, Российская Федерация

² Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ»,
ул. Тестовская, д. 10, Москва, 123112, Российская Федерация

С началом пандемии COVID-19 в мире и Российской Федерации был разработан ряд молекулярно-биологических тестов для диагностики инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Однако результаты применения многочисленных серологических тестов свидетельствуют об их недостаточной чувствительности или специфичности. У существенной части пациентов с подтвержденным ПЦР-диагнозом COVID-19 специфические антитела не обнаруживаются. Существуют доказательства того, что у части выздоровевших гуморальный иммунный ответ является относительно кратковременным. В ряде публикаций показано, что Т-клеточный ответ на человеческие коронавирусы, включая SARS-CoV-1, MERS и SARS-CoV-2, может быть сильным и долговременным. Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 важна не только для стратификации рисков и определения потенциально защищенных групп населения с иммунитетом, приобретенным вследствие перенесенной инфекции, но и для определения иммуногенности и потенциальной эффективности разрабатываемых вакцин. Существующие методики количественной или полуквантитативной оценки специфического Т-клеточного ответа применяются в основном в научных исследованиях и не стандартизованы. **Цель работы:** разработка и апробация тест-системы для выполнения стандартизованной методики определения специфических к антигенам SARS-CoV-2 Т-клеток в периферической крови человека *in vitro*. **Материалы и методы:** разработанный компанией «ГЕНЕРИУМ» набор ТиграТест® SARS-CoV-2, принцип работы которого заключается в определении количества Т-клеток, секретирующих гамма-интерферон *in vitro*. Исследования проводили на образцах венозной крови добровольцев трех групп: условно здоровых, переболевших COVID-19, прошедших вакцинацию против COVID-19. **Результаты:** разработана тест-система для определения специфических к антигенам SARS-CoV-2 Т-клеток в периферической крови человека *in vitro*. Показана специфичность и определена предварительная чувствительность теста ТиграТест® SARS-CoV-2. Исследован диапазон и величина Т-клеточного ответа у переболевших и вакцинированных. Показан выраженный Т-клеточный ответ и у части лиц с отсутствующими симптомами или неподтвержденным диагнозом. Обнаружено, что среднее значение Т-клеточного ответа в отношении пептидов белка-шипа (S-белка) выше у вакцинированных, чем у переболевших. Найдена корреляция между тяжестью заболевания и уровнем Т-клеточного ответа. Определен удельный вклад различных групп антигенов в Т-клеточный ответ после перенесенного заболевания COVID-19. **Выводы:** набор ТиграТест® SARS-CoV-2 является специфичным и чувствительным инструментом в оценке Т-клеточного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, в том числе и для вакцинированных. Разработанный набор целесообразно использовать в клинической практике для комплексной оценки иммунитета к SARS-CoV-2.

Ключевые слова: ELISPOT; SARS-CoV-2; COVID-19; Т-лимфоциты; В-клетки; антитела; вакцина; иммунитет

Для цитирования: Потеряев ДА, Аббасова СГ, Игнатьева ПЕ, Стрижакова ОМ, Колесник СВ, Хамитов РА. Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(3):178–192. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192>

* **Контактное лицо:** Потеряев Дмитрий Александрович; poteryaev@ibcgenerium.ru

Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects, using TigraTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit

D. A. Poteryaev^{1,*}, S. G. Abbasova¹, P. E. Ignatyeva¹, O. M. Strizhakova¹, S. V. Kolesnik², R. A. Khamitov¹

¹ International Biotechnology Center “GENERIUM”,
14 Vladimirskaia St., Volginsky town, Petushinskiy District,
Vladimir Region 601125, Russian Federation

² GENERIUM JSC,
10 Testovskaya St., Moscow 123112, Russian Federation

With the onset of the COVID-19 pandemic, a number of molecular-based tests have been developed to diagnose SARS-CoV-2 infection. However, numerous available serological tests lack sufficient sensitivity or specificity. They do not detect specific antibodies in a significant proportion of patients with PCR-confirmed COVID-19. There is evidence that some convalescents have a relatively short-lived humoral immunity. In contrast, a number of publications have shown that T-cell response to human coronaviruses,

including SARS-CoV-1, MERS, and SARS-CoV-2, can be strong and long-term. Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 is important not only for stratification of risks and identification of potentially protected populations with immunity acquired as a result of previous infection, but also for determining immunogenicity and potential efficacy of vaccines under development. The existing methods of quantitative or semi-quantitative assessment of specific T-cell response are mainly used in scientific research and are not standardised. **The aim of the study** was to develop and verify experimentally a test kit to be used in a standardised procedure for *in vitro* determination of T-cells specific to SARS-CoV-2 antigens, in human peripheral blood. **Materials and methods:** the TigraTest® SARS-CoV-2 kit developed by GENERIUM, which determines the number of T-cells secreting interferon gamma *in vitro*, was tested in the study. Samples of venous blood of volunteers from three different groups were analysed in the study: presumably healthy volunteers; COVID-19 convalescents; individuals vaccinated against SARS-CoV-2. **Results:** the authors developed the TigraTest® SARS-CoV-2 kit for *in vitro* determination of T-cells specific to SARS-CoV-2 antigens in human peripheral blood, demonstrated its specificity and performed preliminary assessment of its sensitivity. The study analysed the range and magnitude of the T-cell response in convalescent and vaccinated individuals. A pronounced T-cell response was also shown in some individuals with no symptoms or with unconfirmed diagnosis. It was discovered that the mean T-cell response to peptides of the spike protein (S-protein) was higher in the vaccinated individuals than in the convalescent patients. A correlation was determined between the severity of the disease and the level of T-cell response. Specific contributions of various groups of antigens to the T-cell response after COVID-19 infection were also determined. **Conclusions:** the TigraTest® SARS-CoV-2 kit is a specific and sensitive tool for the assessment of T-cell immunity to the SARS-CoV-2 virus, which can also be used for vaccinated individuals. The kit may be used in clinical practice for comprehensive assessment of immunity to SARS-CoV-2.

Key words: ELISPOT; SARS-CoV-2; COVID-19; T-cells; B-cells; antibodies; vaccine; immunity

For citation: Poteryaev DA, Abbasova SG, Ignatyeva PE, Strizhakova OM, Kolesnik SV, Khamitov RA. Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects, using TigraTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(3):178–192. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192>

Corresponding author: Dmitry A. Poteryaev; poteryaev@ibcgenerium.ru

Вирус SARS-CoV-2 вызвал глобальную пандемию, которая унесла жизни более 4 млн человек в мире (на момент написания рукописи), нанесла ущерб экономике и продолжает широко распространяться; на сегодняшний день только в Российской Федерации зарегистрировано почти 6 млн подтвержденных случаев¹. Проявления заболевания варьируют от бессимптомной инфекции или инфекции с минимально выраженными симптомами до пневмонии со смертельным исходом. По какой причине у некоторых людей развивается тяжелая форма заболевания, когда другие переносят инфекцию бессимптомно, остается неясным, но степень иммунной защиты является одним из основных объяснений [1–6].

Новые эпидемиологические исследования показывают, что иммунная защита от SARS-CoV-2 формируется, но такой иммунитет не обязательно предотвращает заболевание [7, 8]. В недавнем исследовании датской популяции установлено, что уровень защиты от повторной инфекции после перенесенной инфекции SARS-CoV-2 достигает 85%, но у людей старше 65 лет этот уровень может снижаться до 47% [9]. Долговременность защитного потенциала вакцинации в зависимости от типа вакцин еще только предстоит выяснить. Один из защитных механизмов адаптивного иммунитета включает образование антител. Антитела к нуклеопротеину SARS-CoV-2 и белку-шипу (S-белку) вырабатываются в >70% случаев симптоматической инфекции [10], но у бессимптомно инфицированных лиц сообщалось о генерации Т-клеток, специфичных к SARS-CoV-2, без сероконверсии [11].

В настоящее время иммунные ответы Т-клеток на SARS-CoV-2 изучены в ряде научных исследований с использованием передовых, но сложных и не масштабируемых методов проточной цитометрии или оценки пролиферации Т-клеток. В то же время были разработаны воспроизводимые, стандартизованные и высокопроизводительные серологические методы анализа. Анализы крови на антитела к SARS-CoV-2 были развернуты в больших масштабах, иногда даже без полного понимания их полезности из-за истинного уровня кросс-реактивности некоторых тестов с так называемыми коронавирусами сезонной простуды (HCoV HKU1, 229E, OC43, NL63) [6].

Клеточные иммунные ответы на вирусные инфекции, в частности на SARS-CoV-2, развиваются следующим образом: макрофаги и дендритные клетки, презентующие пептиды вирусных белков, мигрируют в лимфатические узлы, где они избирательно активируют цитотоксические (CD8⁺) и хелперные (CD4⁺) Т-клетки, несущие Т-клеточные рецепторы (TCR), способные специфически взаимодействовать с данными пептидами в составе молекул главного комплекса гистосовместимости I и II класса соответственно. Специфическая активация пептидами вируса приводит к пролиферации отвечающих на стимуляцию Т-клеток и продукции ими внутриклеточных цитотоксических белков перфорина и гранзима B, а также секреции противовирусных Th1-цитокинов — IL-2, TNF-α, IFN-γ, и Th2-цитокинов — IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13. Активированные цитотоксические CD8⁺ Т-клетки мигрируют из лимфоузлов в места инфекции, где уничтожают инфицированные вирусом клетки хозяина, таким образом предотвращая дальнейшую экспансию вируса. Th2-цитокины IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, секретируемые активированными CD4⁺ Т-клетками, приводят к дополнительной активации В-клеток после их взаимодействия с антигенами вируса и усиливают продукцию вирусспецифичных антител [12]. Уровень циркулирующих в крови антител не отражает полный иммунологический статус пациентов в отношении SARS-CoV-2, поскольку около 10–30% пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию, не имеют детектируемого уровня антител к вирусу [10] и титры антител могут быстро снижаться со временем [13]. Для более полной оценки иммунного статуса пациента, помимо гуморального ответа, необходимо определять Т-клеточный иммунитет в отношении специфических антигенов вируса SARS-CoV-2, поскольку Т-клеточный ответ может развиваться до проявления гуморального иммунного ответа [12]. В литературе есть данные о том, что специфически активированные Т-клетки (как CD4⁺, так и CD8⁺) могут быть обнаружены уже через 1 неделю после появления первых симптомов инфекции [14].

Специфические Т-клетки генерируются в большом количестве в ответ на инфекцию и детектируются после вакцинации (если вакцина имеет потенциал к стимуляции не только гуморального, но и клеточного иммунитета). Т-клеточные ответы

¹ <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>

после перенесенной инфекции более устойчивы во времени [15], в отличие от уровня антител [13]. Они комплементарны серологическим методам для выявления людей, перенесших инфекцию. Т-клеточный ответ на антигены SARS-CoV-2 с большой вероятностью является определяющим в защитном иммунитете [16].

Исследования Т-клеточного иммунитета в контексте новой коронавирусной инфекции особенно актуальны, хотя в литературе обнаруживаются противоречивые данные, вероятно, из-за отсутствия стандартизации методики.

В ноябре 2020 г. британские ученые опубликовали результаты когортного исследования сотрудников здравоохранения, полиции и пожарных («ключевых работников») в Великобритании [16]. Исследование кроме серологических методов включало определение уровня Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2. Анализ данных свидетельствует о том, что определенный уровень реагирующих на SARS-CoV-2 Т-клеток может быть достаточным для защиты от COVID-19 даже у серонегативных субъектов, и одни только серологические исследования могут быть недостаточными при оценке тех, кто подвергается более низкому риску заболевания COVID-19 [16]. Кроме того, Т-клеточный ответ обнаруживался в подтвержденных ПЦР случаях инфекции COVID-19, в то время как серологический тест на антитела давал отрицательный результат [16].

Опубликованные данные позволяют предположить следующее:

- стратификация риска на индивидуальном уровне может быть более точно определена с использованием Т-клеточных анализов;
- содержание Т-клеток, специфически реагирующих на SARS-CoV-2, снижается с возрастом, что может объяснить более высокую частоту и тяжесть заболевания в этой группе, особенно при отсутствии антител (серология).

Описанный в работе D. Wyllie с соавт. [16] анализ Т-клеток выполнялся с помощью технологии IGRA-ELISPOT (Interferon-Gamma Release Assay — Enzyme Linked Immunosorbent Spot analysis; тест на секрецию гамма-интерферона — иммуноферментный анализ пятен). Технология ELISPOT нашла широкое применение, например, для диагностики туберкулезной инфекции [17]. Важно, что ELISPOT приемлем как по стоимости, так и по уровню сложности выполнения и его способности к автоматизации для широкомасштабных исследований и массового применения [18].

Компания «ГЕНЕРИУМ» разработала набор ELISPOT для определения реактивных на антигены SARS-CoV-2 Т-клеток в крови (ТиграТест® SARS-CoV-2). В настоящий момент набор для исследовательских целей выпускается промышленными сериями, успешно закончена его апробация на образцах крови добровольцев и начаты клинико-лабораторные испытания для регистрации в качестве диагностического теста *in vitro*.

Цель работы — разработка и апробация тест-системы для выполнения стандартизированной методики определения специфических к антигенам SARS-CoV-2 Т-клеток в периферической крови человека *in vitro* и определение рабочих характеристик теста. В ходе работы были поставлены и решены следующие задачи:

- предварительное определение специфичности и чувствительности теста к выявлению перенесенной инфекции, вызванной SARS-CoV-2;
- определение уровня Т-клеточного ответа у переболевших и вакцинированных лиц;
- оценка зависимости степени выраженности Т-клеточного ответа от тяжести перенесенного заболевания;
- изучение Т-клеточного ответа на разные группы антигенов SARS-CoV-2.

Таблица 1. Группы доноров для анализа Т-клеток, специфически отвечающих на антигены SARS-CoV-2, методом ELISPOT
Table 1. Donor groups in the study of T-cell specific response to SARS-CoV-2 antigens by ELISPOT

Группа по анамнезу к COVID-19 Groups by COVID-19 medical history	Распределение доноров по серологическому статусу Groups of volunteers by their serological status		
	серонегативный по антигенам SARS-CoV-2 seronegative to SARS-CoV-2 antigens	серопозитивный по антигенам SARS-CoV-2 seropositive to SARS-CoV-2 antigens	серологический статус не известен serological status not known
Условно здоров, отрицает перенесенное заболевание COVID-19 или его симптомы в анамнезе Presumed healthy subjects who claim no COVID-19 or its symptoms in the past	1	0	43
Лицо с подтвержденным лабораторными методами (ПЦР и/или серологическими) или компьютерной томографией заболеванием COVID-19 COVID-19 confirmed by laboratory methods (PCR or serology) or computed tomography	1	12	35
Условно здоров, отрицает перенесенное заболевание COVID-19 или его симптомы в анамнезе, но заявляет о близком и/или продолжительном контакте с больными COVID-19 Presumed healthy subjects who claim no COVID-19 or its symptoms in the past, but claim a close or long contact with COVID-19 patients	7	0	14
Статус не известен Status not known	0	0	129
Вакцинированный против COVID-19 Vaccinated against COVID-19	0	17	0

Материалы и методы

Пациенты. Образцы крови

Перед началом проведения исследования добровольцы заполняли опросный лист с указанием основных характеристик пациента, симптомов заболевания, наличия или отсутствия подтверждения инфекции SARS-CoV-2 лабораторными методами, наличия или отсутствия подтверждения диагноза пневмонии компьютерной томографией. Условно здоровые доноры также указывали наличие или отсутствие близких или продолжительных контактов с больными COVID-19.

Образцы венозной крови были отобраны в процедурном кабинете МБЦ «ГЕНЕРИУМ» в период с ноября 2020 по февраль 2021 г. в Москве или, в тот же период, в п. Вольгинский Владимирской области. От каждого донора было получено добровольное информированное согласие на забор образцов крови и включение результатов их анализа в данное исследование. Проведение исследования было одобрено локальным независимым этическим комитетом при МБЦ «ГЕНЕРИУМ» (протокол № 01 от 11.11.2020).

Всего были взяты образцы крови у 245 пациентов, у некоторых из них забор крови осуществляли более 1 раза в разное время, включая тех, от кого были получены образцы до и после перенесенного заболевания COVID-19 или проведения вакцинации. Таким образом, для анализов ELISPOT всего было собрано 279 образцов.

Доноров распределяли по группам (табл. 1). Забор крови у вакцинированных происходил в интервале 3–6 нед. после получения всех необходимых доз вакцины. У переболевших COVID-19 кровь отбирали в интервале от 2 нед. до 9 мес. после исчезновения симптомов заболевания или наличия отрицательного теста ПЦР.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли методом центрифугирования в градиенте фикола не позднее чем через 8 ч после забора крови. Для анализа ELISPOT использовали либо свежевыделенные, либо криоконсервированные МКПК, замороженные согласно валидированному протоколу [19], которые хранили при минус 196 °C до анализа.

Дизайн антигенов для ТиграТест® SARS-CoV-2

Пептиды для стимуляции специфических Т-клеток, соответствующие основным белковым антигенам коронавируса SARS-CoV-2, были выбраны на основе анализа публикаций, идентифицировавших репертуар и встречаемость различных эпитопов Т-клеточных рецепторов (TCR) у пациентов и переболевших COVID-19 [3, 20–23]. С помощью биоинформатического анализа были исключены в основном те пептиды, которые способны давать значительную кросс-реактивность с Т-клеточными эпитопами так называемых простудных коронавирусов штаммов OC43, NL63, 229E, HKU1. Для выбора оптимального набора пептидов учитывали также распространенность эпитопов TCR и их соответствие генотипам HLA в человеческой популяции [3, 21–25]. Были приготовлены пептидные пулы для 5 белков, являющихся наиболее часто встречающимися мишенями CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток у переболевших COVID-19: S-белок (шип), нуклеокапсидный белок (N), мембранный белок (M) и 2 вспомогательных белка ORF3a и ORF7a. С целью обеспечения удобства тестирования и отличия случаев естественного иммунитета после перенесенной инфекции от неинфицированных людей, получивших иммунопрофилактику вакциной, основанной только на S-белке, было сформировано 2 пула пептидов: пептиды исключительно S-белка (АГ1) и смешанные пептиды белков N, M, ORF3a и ORF7a (АГ2).

IFN-γ ELISPOT

Анализ ELISPOT выполняли в соответствии с инструкцией производителя набора ТиграТест® SARS-CoV-2 (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия). МКПК каждого добровольца инкубировали в течение 16–24 ч с пептидными антигенами (концентрация каждого пептида в пуле составляла 2 мкг/мл). Индивидуальный тест для каждого донора состоял из 4 лунок:

- отрицательный контроль, без стимуляции МКПК;
- стимуляция пептидами S-белка (АГ1);
- стимуляция пептидами белков N, M, ORF3a и ORF7a (АГ2);
- положительный контроль (стимуляция всех жизнеспособных и функционально активных Т-клеток с помощью антигена к CD3, клон ОКТ-3).

В каждую лунку вносили 350000 МКПК. На поверхности иммунологического планшета для ELISPOT (MultiScreen HTS IP с мембраной Dugapore PVDF Merk-Millipore, кат. № MVHVN4525) было предварительно сорбировано моноклональное антитело к IFN-γ (производство МБЦ «ГЕНЕРИУМ», клон K48). После инкубации и отмывки пятна проявляли с помощью другого антитела к IFN-γ, конъюгированного со щелочной фосфатазой (производство МБЦ «ГЕНЕРИУМ», клон 1G9) и хромогенного субстрата BCIP/NBT (5-бromo-4-хлоро-3-индолил-фосфат/нитросиний тетразолия хлорид, Sigma-Aldrich). Подсчет пятен (спотов) производили как визуально под стереомикроскопом, так и с помощью специализированного ELISPOT ридера AID Classic ELR08 (AID GmbH, Германия). Величину Т-клеточного ответа выражали как количество подсчитанных пятен в лунке АГ1 или АГ2 за вычетом количества пятен в отрицательном контроле (без стимуляции антигенами). Критерием приемлемости теста были результаты положительного и отрицательного контролей. В положительном контроле должно было быть не менее 100 пятен, в отрицательном контроле — не более 14 пятен. Наличие более 14 пятен могло свидетельствовать об остром воспалительном процессе или о случайном загрязнении образца клеток эндотоксинами. В таком случае донору предлагали повторно сдать кровь через 1–2 недели.

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов, включая определение достоверности различий между группами и ROC (receiver operating characteristic) анализ, выполнялась с использованием программы GraphPad Prism 6.

Результаты

Иммунологический набор ТиграТест® SARS-CoV-2 был разработан для оценки специфического Т-клеточного иммунитета у лиц, перенесших коронавирусную инфекцию, а также у прошедших иммунопрофилактические мероприятия (вакцинацию) против COVID-19. В ходе апробации набора анализ IGRA-ELISPOT, выявляющий эффекторные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, специфически реагирующие на антигены SARS-CoV-2, был проведен у 245 добровольцев. Распределение групп доноров описано в разделе «Материалы и методы» и в таблице 1. На рисунке 1 показаны типичные примеры положительного результата анализа у переболевшего COVID-19 и вакцинированного человека. У этих же лиц ТиграТест® SARS-CoV-2 не выявлял специфических к SARS-CoV-2 Т-клеток в количестве, превышающем фоновый уровень, если анализ был сделан до болезни или вакцинации Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) (рис. 1А, 1В). У переболевших COVID-19 Т-клеточный ответ, как правило, был выявлен как на пептиды пула АГ1, так и на пептиды пула АГ2, что согласуется с ранее опубликованными данными [3]. У вакцинированных Гам-КОВИД-Вак лиц, которые до анализа

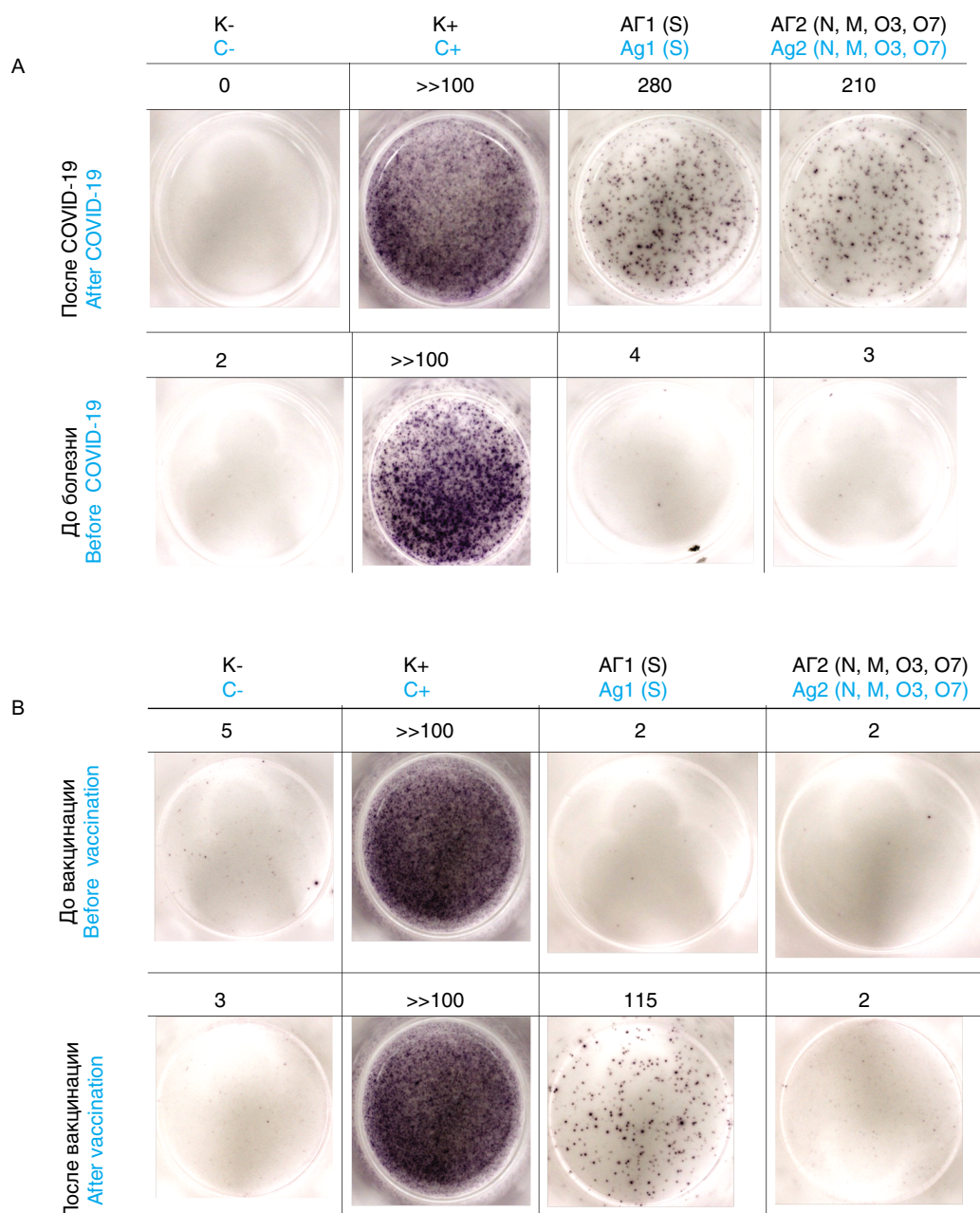


Рис. 1. Примеры результатов анализа ТиграТест® SARS-CoV-2. А — нижняя панель («До болезни»): анализ выполнен у пациента X до заболевания COVID-19. МПКП выделены в ноябре 2020 г. Верхняя панель («После COVID-19»): анализ выполнен у того же пациента после перенесенного заболевания COVID-19. МПКП выделены в январе 2021 г. В — верхняя панель («До вакцинации»): анализ выполнен у не болевшего COVID-19 пациента Y до вакцинации. МПКП выделены в ноябре 2020 г. Нижняя панель («После вакцинации»): анализ выполнен у того же пациента через 1 неделю после 2 необходимых доз вакцины Гам-КОВИД-Вак. МПКП выделены в декабре 2020 г. К- — отрицательный контроль (без антигенов); К+ — положительный контроль (стимуляция всех функционально активных Т-клеток анти-CD3 антителом); АГ1 (S) — стимуляция пулом пептидов S-белка; АГ2 (N, M, O3, O7) — стимуляция пулом пептидов белков N, M, ORF3a, ORF7a. Цифры над фотографиями лунок означают число пятен, подсчитанных автоматическим ELISPOT-ридером.

Fig. 1. Examples of results obtained with the TigraTest® SARS-CoV-2 kit. A—the bottom panel (“Before COVID-19”): the analysis was performed in the patient X prior to COVID-19. PBMCs were isolated in November 2020. The upper panel (“After COVID-19”): the analysis was performed in the same patient after recovery from COVID-19. PBMCs were isolated in January 2021. B—the upper panel (“Before vaccination”): the analysis was performed in the non-COVID-19 patient Y before vaccination. PBMCs were isolated in November 2020. The bottom panel (“After vaccination”): the analysis was performed in the same patient 1 week after 2 required doses of the SARS-CoV-2 vaccine Gam-COVID-Vac. PBMCs were isolated in December 2020. C-—negative control (without antigens); C+—positive control (stimulation of all functionally active T cells with an anti-CD3 antibody); Ag1 (S)—stimulation with a pool of S-protein peptides; Ag2 (N, M, O3, O7)—stimulation with a pool of peptides of N, M, ORF3a, ORF7a proteins. The numbers above the photographs of the wells indicate the number of spots counted by the automatic ELISPOT reader.

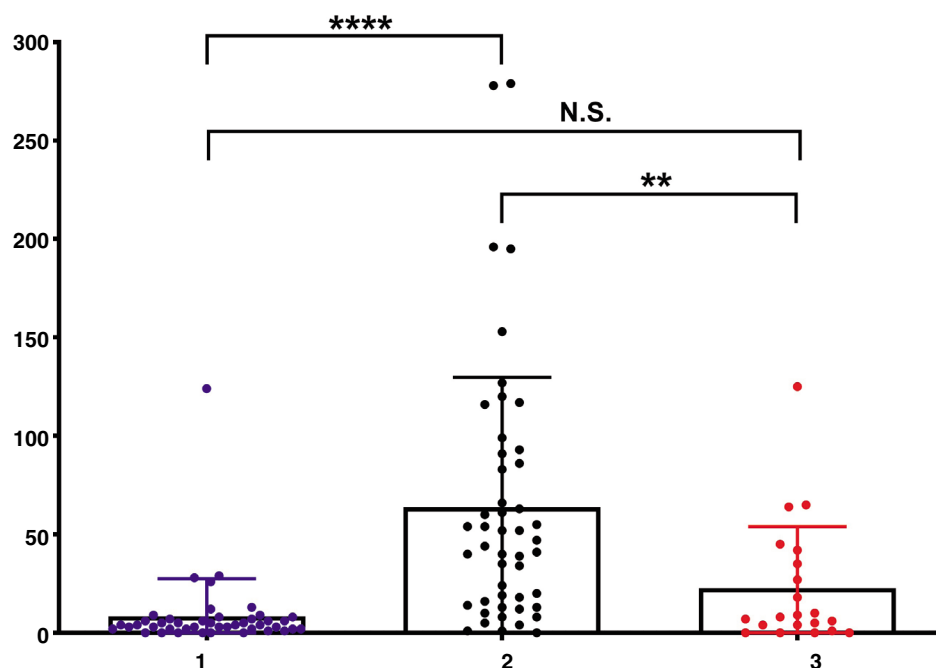


Рис. 2. Распределение и сравнение величины Т-клеточного ответа, выявляемого набором ТиграТест® SARS-CoV-2, у различных групп пациентов. Продукцию IFN γ после инкубации МКПК пациентов с пептидами SARS-CoV-2 детектировали с помощью ELISPOT. Ось ординат — количество пятен в лунке после культивирования 350000 МКПК с антигенами SARS-CoV-2. Для сравнительного анализа между группами использовали наибольшее из полученных значений для лунок с антигенами — либо АГ1 (пептиды S-белка), либо АГ2 (пептиды белков S, N, M, ORF3a, ORF7a) для каждого индивидуального пациента. Ось абсцисс — наименование групп доноров. 1 — условно здоровые доноры, отрицающие перенесенное заболевание COVID-19 ($n = 44$); 2 — перенесенная инфекция SARS-CoV-2 или перенесенное заболевание COVID-19, подтвержденные лабораторными или клиническими методами ($n = 48$); 3 — условно здоровые доноры, заявляющие о близком или продолжительном контакте с больным COVID-19 ($n = 21$). Показано различие Т-клеточного ответа на антигены SARS-CoV-2 у условно здоровых субъектов и пациентов, перенесших инфекцию SARS-CoV-2. Для статистического анализа использовали тест Крускала–Уоллиса (множественное сравнение). ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. N. S. — отличия статистически незначимы ($p > 0,05$).

Fig. 2. Distribution and comparison of the magnitude of the T-cell response detected by the TиграТест® SARS-CoV-2 kit in different groups of patients. IFN γ production was determined by ELISPOT after incubation of patient PBMCs with SARS-CoV-2 peptides. Y-axis shows the number of spots in the well after cultivation of 350000 PBMCs with SARS-CoV-2 antigens. The comparative analysis of the groups used the highest value obtained for the wells with antigens—either Ag1 (S-protein peptides) or Ag2 (peptides of S, N, M, ORF3a, ORF7a proteins)—for each individual patient. X-axis—groups of donors. 1—presumably healthy donors who claim no COVID-19 in the past ($n = 44$); 2—previous SARS-CoV-2 infection or COVID-19 disease, confirmed by laboratory or clinical methods ($n = 48$); 3—presumably healthy donors who claim a close or long-term contact with a COVID-19 patient ($n = 21$). The T-cell response to SARS-CoV-2 antigens in the presumably healthy subjects differs from that in the patients after SARS-CoV-2 infection. The Kruskal–Wallis test (multiple comparison) was used for statistical analysis. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. N. S. — the differences are not statistically significant ($p > 0.05$).

не имели продолжительного контакта с больными COVID-19, ответ выявляли только на пептид АГ1 (пептиды S-белка), что свидетельствует о том, что Т-клеточный ответ сформировался именно в результате вакцинации, а не является следствием естественно перенесенной инфекции.

Оценку специфичности и величины Т-клеточного ответа на новую коронавирусную инфекцию с помощью набора ТиграТест® SARS-CoV-2 проводили на трех группах добровольцев. Для оценки специфичности была взята группа с низким риском перенесенной инфекции COVID-19. Необходимо отметить, что мы не имели возможности работать с банком МКПК доноров до начала пандемии. Поэтому в этой популяции также могли быть люди, перенесшие инфекцию без заметных симптомов и имеющие специфический Т-клеточный ответ. Вторая группа состояла из лиц, перенесших COVID-19 или бессимптомную инфекцию COVID-19, подтвержденную лабораторными методами. Третья группа состояла из лиц, отрицающих перенесенную инфекцию в анамнезе, но заявляв-

ших о близких или продолжительных контактах с больными COVID-19.

Т-клеточный ответ в группе инфицированных SARS-CoV-2 (рис. 2) значительно отличается от группы условно здоровых с низким риском перенесенной инфекции и от условно здоровых с высоким риском перенесенной инфекции. Средняя величина ответа у инфицированных людей составила 65 (± 66) пятен на 350000 МКПК против 9 (± 19) и 23 (± 31) у условно здоровых с низким и высоким риском перенесенной инфекции соответственно. Несмотря на то что в данной выборке не наблюдается статистически значимого различия по уровню Т-клеточного ответа между условно здоровыми донорами с высоким и низким риском перенесенной инфекции, тенденция к такому различию прослеживается.

На момент проведения исследования в Российской Федерации уже началась иммунопрофилактика COVID-19 отечественными вакцинами. Была набрана группа лиц, получивших вакцинацию зарегистрированным в Российской Федерации препаратом Гам-КОВИД-Вак. Т-клеточный ответ на S-белок SARS-CoV-2,

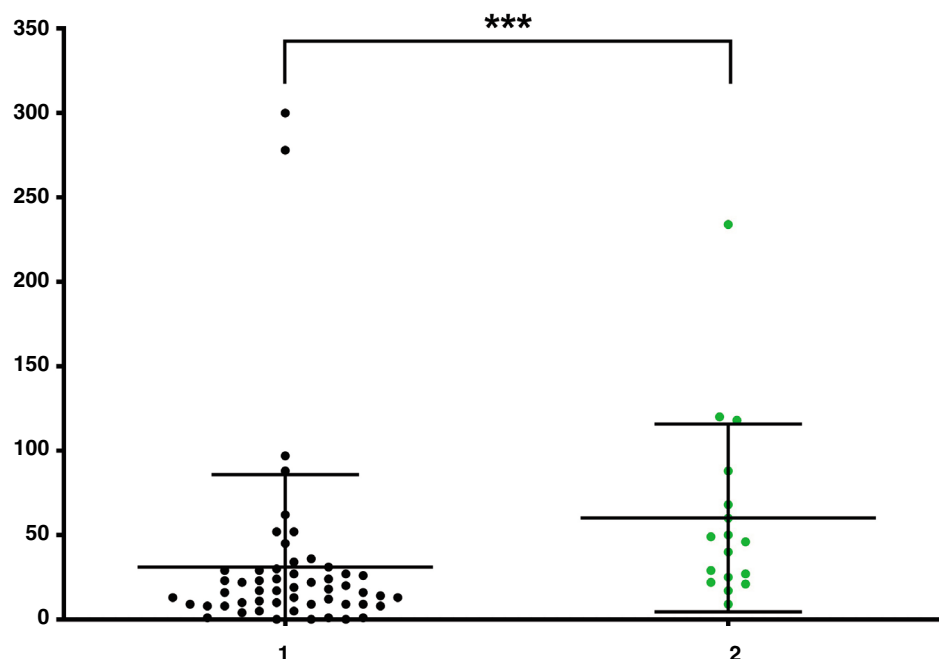


Рис. 3. Распределение и сравнение величины Т-клеточного ответа в отношении пептидов S-белка SARS-CoV-2, выявляемого набором ТиграТест® SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19 (реконвалесценты), включая предположительно бессимптомную инфекцию ($n = 51$), и вакцинированных против COVID-19 здоровых добровольцев ($n = 17$). Ось ординат — количество пятен в лунке с 350000 МКПК. Оценивались только пятна в лунке АГ1 (пептиды S-белка). Ось абсцисс — наименование групп доноров. 1 — реконвалесценты и серопозитивные; 2 — вакцинированные. Среднее значение Т-клеточного ответа у вакцинированных значительно превышает таковой у реконвалесцентов COVID-19 и серопозитивных по SARS-CoV-2 лиц. Для статистического анализа использовался тест Манна–Уитни (непараметрический, для групп с ненормальным распределением). *** $p < 0,0001$.

Fig. 3. Distribution and comparison of the magnitude of the T-cell response to the peptides of the SARS-CoV-2 S-protein detected by the TigraTest® SARS-CoV-2 kit in the patients with COVID-19 (convalescents), including presumably asymptomatic infection ($n = 51$), and healthy subjects vaccinated against SARS-CoV-2 ($n = 17$). Y-axis shows the number of spots in a well with 350000 PBMCs. The experiment assessed only the spots in the Ag1 well (S-protein peptides). X-axis—groups of donors. 1—convalescent and seropositive patients; 2—vaccinated individuals. The mean T-cell response in the vaccinated individuals significantly exceeds those of the COVID-19 convalescents and SARS-CoV-2 seropositive individuals. The Mann–Whitney test (nonparametric, for groups with non-normal distribution) was used for statistical analysis. *** $p < 0.0001$.

определенный с помощью набора ТиграТест® SARS-CoV-2, был сравнен с таковым у группы переболевших COVID-19 (реконвалесцентов) и серопозитивных по антигенам SARS-CoV-2. Среднее количество Т-клеток, специфичных к S-белку, было значительно выше ($p < 0,0001$) у вакцинированных добровольцев, чем у естественно перенесших коронавирусную инфекцию (рис. 3).

Следующим этапом работы было определение возможной корреляции между уровнем Т-клеточного ответа, детектируемого набором ТиграТест® SARS-CoV-2, и тяжестью перенесенного заболевания COVID-19. Действительно, среднее количество Т-клеток, специфичных для антигенов SARS-CoV-2, значительно ($p < 0,05$) выше у переболевших COVID-19 с перенесенной умеренной или тяжелой формой заболевания, чем у лиц с инфекцией, протекавшей в легкой форме (рис. 4).

В ходе предварительного анализа ROC (данные не представлены) определяли пороговое значение для интерпретации результатов теста ТиграТест® SARS-CoV-2: более 12 пятен в лунках с пептидами (после вычета количества пятен в отрицательном контроле) было определено как «положительный результат». На основании этого порога проанализировали частоты Т-клеточных ответов на разные группы антигенов во всей исследовательской выборке, давшей положительный результат теста ($n = 119$). Было показано, что S-белок является одной из основных, но не иммунодоминантной мишенью для Т-клеток. В среднем более сильные ответы наблюдались

на пептиды объединенной группы структурных белков N, M, ORF3a, ORF7a (NMO) (рис. 5 и 6).

Пороговое значение теста между положительным и отрицательным результатом было дополнительно подтверждено проведением анализа ТиграТест® SARS-CoV-2 на выборке из 43 реконвалесцентных пациентов с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2 (для определения чувствительности) и 44 условно здоровых добровольцев с низким риском перенесенной инфекции (для определения специфичности). Основным математическим средством оценки эффективности диагностических тестов является метод, основанный на анализе так называемой операционной характеристической кривой (ROC-кривая; ROC — receiver operating characteristic curve); ROC-анализ предусматривает сравнение операционных характеристик теста — чувствительности и специфичности. В качестве интегральной характеристики для оценки эффективности теста используется площадь под ROC-кривой. Для расчета порогового значения, при превышении которого негативный результат теста меняется на позитивный, использовался метод Юдена. Индекс Юдена (J) — один ключевой компонент ROC-анализа, определяет максимальную потенциальную эффективность биомаркера, определяется как $J = \max_c \{Se(c) + Sp(c) - 1\}$, где Se — чувствительность, Sp — специфичность при каждом выбранном пороговом значении (c) на кривой ROC.

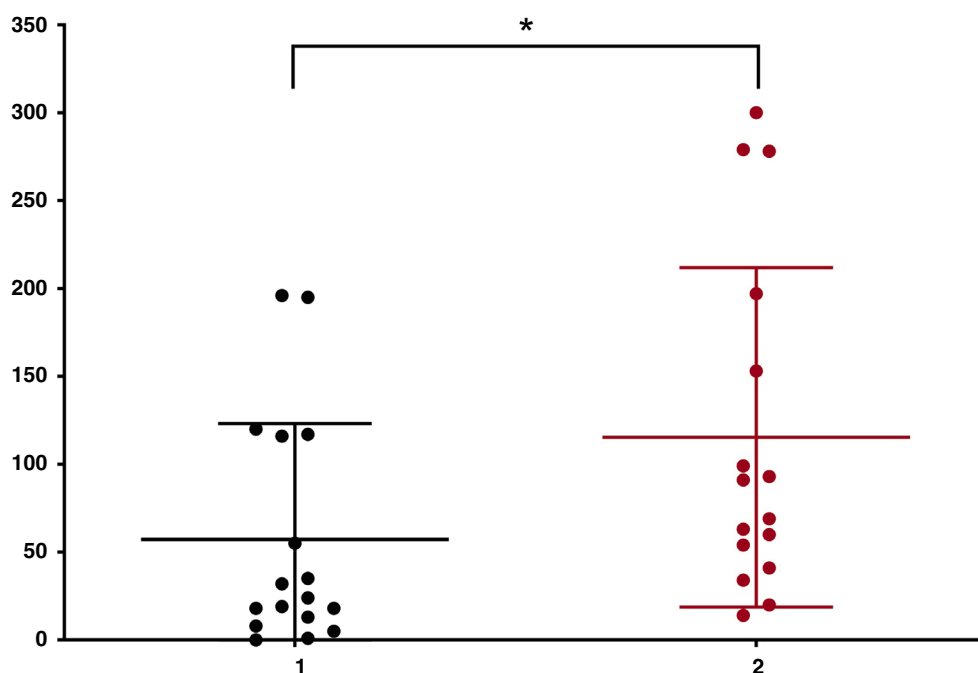


Рис. 4. Распределение и сравнение величины Т-клеточного ответа, выявляемого набором ТиграТест® SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19 в зависимости от тяжести перенесенного заболевания. Ось ординат — количество пятен в лунке с 350000 МКПК. Ось абсцисс — наименование групп доноров. 1 — легкая форма COVID-19, при инфекции SARS-CoV-2, подтвержденной ПЦР, была определена при наличии следующих симптомов: повышение температуры тела ($\leq 37,8$ °C) в течение не более 3 сут; боль в горле, заложенность носа или насморк, изменение/потеря обоняния, усталость; 2 — умеренная и тяжелая формы. Умеренная форма при подтверждении инфекции SARS-CoV-2 ПЦР была определена при наличии следующих симптомов: повышение температуры тела (>38 °C) более 3 сут, лихорадка, усталость, боль в теле и мышцах, общее болезненное состояние. Тяжелая форма характеризовалась любыми из симптомов умеренной формы дополнительно к одышке, дискомфорту в грудной клетке, признакам гипоксии или диагностированной пневмонии с помощью компьютерной томографии. Для статистического анализа использовался тест Манна–Уитни (непараметрический, для групп с ненормальным распределением). * $p < 0,05$.

Fig. 4. Distribution and comparison of the magnitude of the T-cell response detected by the TиграТест® SARS-CoV-2 kit in the COVID-19 patients, depending on the severity of the disease. Y-axis—spot number per well with 350000 PBMCs. X-axis—groups of donors. 1—mild COVID-19, with SARS-CoV-2 infection confirmed by PCR, was determined based on the following symptoms: an increase in body temperature (≤ 37.8 °C) for no more than 3 days; sore throat, nasal congestion or runny nose, change/loss of smell, fatigue; 2—moderate and severe COVID-19. The moderate form, with SARS-CoV-2 infection confirmed by PCR, was determined based on the following symptoms: an increase in body temperature (>38 °C) for more than 3 days, fever, fatigue, pain in the body and muscles, general sickness. The severe form was characterised by any of the moderate symptoms in addition to shortness of breath, chest discomfort, signs of hypoxia, or computed tomography diagnosed pneumonia. The Mann–Whitney test (nonparametric, for groups with non-normal distribution) was used for statistical analysis. * $p < 0.05$.

Пороговое значение, дающее максимальную величину J , считается оптимальным, поскольку оно оптимизирует дифференцирующую способность биомаркера в том случае, когда чувствительность и специфичность одинаково важны.

Результаты тестов ТиграТест® SARS-CoV-2 для данной выборки реконвалесцентов и условно здоровых добровольцев использовались для проведения анализа ROC (рис. 7). Пороговое значение 12 пятен в любой из лунок АГ1 или АГ2 за вычетом количества пятен в отрицательном контроле обеспечивает максимальное разделение двух когорт доноров. При выборе этого порогового значения чувствительность и специфичность теста по способности определять факт перенесенной инфекции SARS-CoV-2 составляют 92 и 89% соответственно.

Эти же данные, но с добавлением когорты условно здоровых доноров, заявлявших о близких или продолжительных контактах с больными COVID-19, были использованы для демонстрации полезности введения категории «пограничного результата» (рис. 8). Так, у 86% доноров в когорте с низким риском перенесенной инфекции SARS-CoV-2, не проявляющих никакой или имеющих низкий уровень реактивности на антигены SARS-CoV-2, было менее 10 пятен; менее 12 пятен было уже

у 89% субъектов этой когорты. В когорте с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2 60% реконвалесцентов имели результат теста более 35 пятен в лунке, а 27% пациентов в этой же когорте — результат теста с числом пятен в интервале от 13 до 35. Таким образом, в пограничной зоне от 10 до 12 пятен наблюдали наибольшее перекрытие когорт. Вследствие этого при получении такого «пограничного» результата рекомендовали повторить тест.

В целом наблюдалась хорошая сходимость положительных результатов теста ТиграТест® SARS-CoV-2 с подтвержденным диагнозом COVID-19. В группе из 48 добровольцев, состоящей из переболевших COVID-19 или предположительно инфицированных SARS-CoV-2 в прошлом, чей диагноз был подтвержден либо ПЦР, либо типичной симптоматикой и компьютерной томографией, либо серологическими методами (но без характерных клинических симптомов), при условии, что интервал между установлением диагноза и выполнением ТиграТест® SARS-CoV-2 составлял от 2 нед. до 9 мес., сходимость положительных результатов — 83,8% (40/48). Если из этой группы исключить добровольцев, чей диагноз был подтвержден только серологическими методами, но у кого типичная симптома-

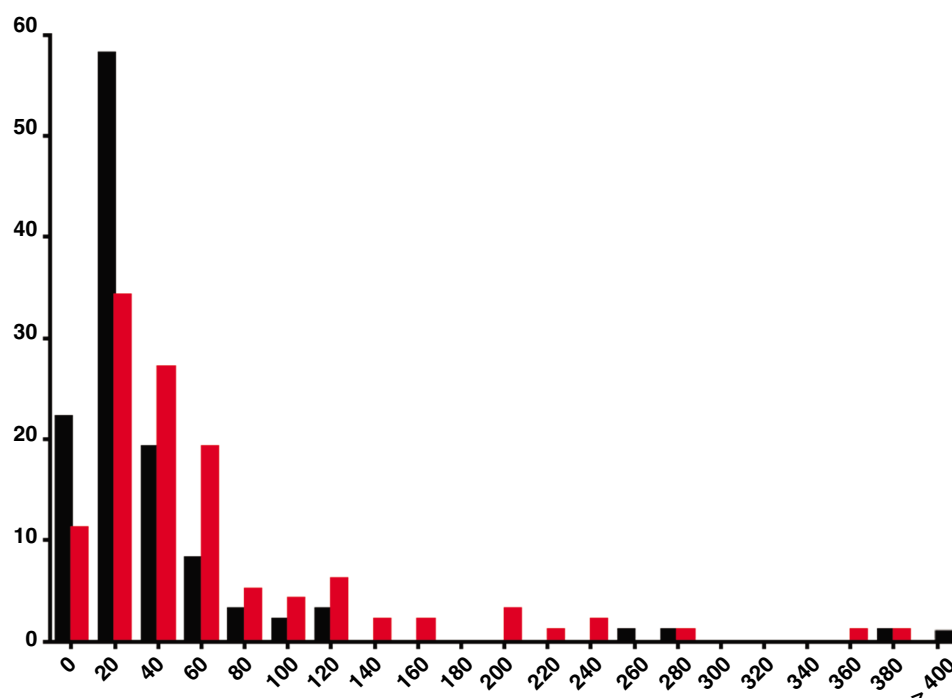


Рис. 5. Распределение количества пятен, выявляемых тестом ТиграТест® SARS-CoV-2 у пациентов с положительным результатом теста. Показана относительная частота различного количества пятен. Ось абсцисс — количество пятен в лунке (на 350000 МКПК). ■ количество определенных пятен в панели антигенов АГ1 (пептиды S-белка) за вычетом пятен в лунке отрицательного контроля; ■ количество пятен в панели АГ2 (пептиды белков NMO: N, M, ORF3a, ORF7a) за вычетом пятен в лунке отрицательного контроля. Ось ординат — количество положительных тестов для данного значения количества пятен в лунке.

Fig. 5. Distribution of the number of spots detected by the TigraTest® SARS-CoV-2 kit in the patients with a positive test result. The figure shows the relative frequency of different numbers of spots. X-axis—the number of spots in the well (per 350000 PBMCs). ■ number of spots in the Ag1 antigen panel (S-protein peptides) minus the spots in the negative control well; ■ the number of spots in the Ag2 panel (peptides of NMO proteins: N, M, ORF3a, ORF7a) minus the spots in the negative control well. Y-axis—the number of positive tests for the number of spots in the well.

тика COVID-19 отсутствовала, сходимость составляла уже 93% (40/43). Сходимость достигала 97,6% (40/41), если дополнительно исключить переболевших COVID-19, у которых время между установлением диагноза и анализом с применением ТиграТест® SARS-CoV-2 было более 6 мес.

Обсуждение

В то время как иммунная память является источником долгосрочного иммунитета к SARS-CoV-2, еще рано делать прямые выводы о его защитном потенциале, основываясь только на количественных оценках циркулирующих антител, В-клеток памяти, реактивных CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток, поскольку механизм действия защитного иммунитета против SARS-CoV-2 у людей недостаточно изучен. Тем не менее уже в настоящее время можно дать некоторые разумные интерпретации. Антитела — единственный компонент иммунной памяти, который может обеспечить действительно стерилизующий иммунитет. Например, исследования вакцин на приматах показали положительную корреляцию между титрами нейтрализующих вирус SARS-CoV-2 антител и дозами попадающего в верхние дыхательные пути вируса, от которых обеспечивается полная защита (стерилизующий иммунитет) [26]. Несмотря на это прямые сравнения клинических исследований вакцин не всегда возможны, поскольку анализы нейтрализующих антител не стандартизированы [27].

Помимо стерилизующего иммунитета, ограничение распространения SARS-CoV-2 только верхними дыхательными путями снизит тяжесть заболевания COVID-19 до «обычной простуды»

или бессимптомного заболевания. Достижение такого результата является основной целью применяемых и разрабатываемых вакцин против COVID-19. Такой результат потенциально может быть опосредован координированным действием CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток и В-клеток как эффекторных, так и клеток памяти, специфичных для антигенов коронавируса. Такое действие приводит к высокому уровню нейтрализующих антител, как было продемонстрировано для других вирусных инфекций [2, 28]. Наличие у пациента CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток, специфичных к SARS-CoV-2, связано с уменьшением тяжести заболевания COVID-19 при текущей инфекции, а быстрая сероконверсия ассоциируется со значительным снижением вирусной нагрузки при остром заболевании COVID-19 в течение 14 суток [4]. Данные наблюдения согласуются с гипотезой о том, что Т- и В-клетки памяти при повторной инфекции могут существенно ограничить распространение SARS-CoV-2 и/или снизить кумулятивную вирусную нагрузку, что приведет к значительному снижению тяжести заболевания COVID-19. Вероятность таких исходов будет определяться кинетикой инфекции, поскольку активация В- и Т-клеток памяти может занимать от 3 до 5 суток, чтобы успешно отреагировать на инфекцию. Учитывая относительно медленное течение тяжелой формы заболевания COVID-19 у людей, имеется большое временное окно для активации покоящихся отделов иммунной памяти, которые могут внести значимый вклад в защитный иммунитет против пневмонии, тяжелого или смертельного заболевания COVID-19.

При рассмотрении потенциальных связей между иммунной памятью и защитным иммунитетом важно учитывать до-

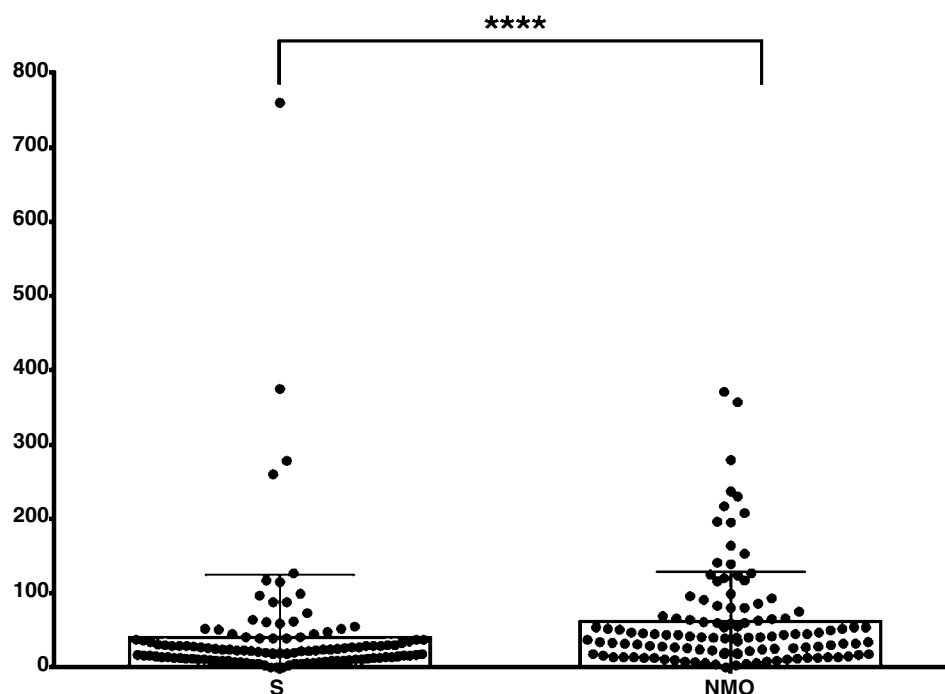


Рис. 6. Распределение и сравнение величины Т-клеточного ответа, выявляемого набором ТиграТест® SARS-CoV-2 у всех пациентов с положительным результатом теста, в зависимости от тестируемых антигенов. Ось ординат: количество пятен в лунке (на 350000 МКПК). Ось абсцисс: S — пептиды S-белка, NMO — пептиды белков N, M, ORF3a, ORF7a. Для статистического анализа использовался тест Манна–Уитни (непараметрический, для групп с ненормальным распределением). **** $p < 0,0001$.

Fig. 6. Distribution and comparison of the magnitude of the T-cell response detected by the TиграТест® SARS-CoV-2 kit in all patients with a positive test result, depending on the antigens tested. Y-axis: number of spots in the well (per 350000 PBMCs). X-axis: S—peptides of S-protein, NMO—peptides of N, M, ORF3a, ORF7a proteins. The Mann–Whitney test (nonparametric, for groups with non-normal distribution) was used for statistical analysis. **** $p < 0.0001$.

ступные эпидемиологические данные. Уже можно считать задокументированным факт о том, что повторное инфицирование SARS-CoV-2 происходит [7, 8]. С увеличением возраста пациентов (>65 лет) вероятность повторного заражения достигает угрожающего значения [8]. Адаптивный иммунный ответ на повторное инфицирование коронавирусом отличается высокой степенью неоднородности. В результате неоднородности иммунного ответа можно ожидать, что по крайней мере часть инфицированной SARS-CoV-2 популяции с недостаточным уровнем иммунной памяти будет подвержена повторной инфекции [29].

За прошедший год выполнено множество исследований гуморального и клеточного ответа на COVID-19; также опубликованы результаты клинических исследований иммуногенности и эффективности нескольких вакцин. Если первые исследования были ограничены по выборке пациентов и времени наблюдения, то сейчас появляются работы [29], оценивающие многие компоненты иммунитета у переболевших в динамике на протяжении более 6 мес. В этих работах продемонстрировано, что если у переболевших COVID-19 уровень антител, в первую очередь нейтрализующих антител к SARS-CoV-2, был достаточно высоким после перенесенного заболевания, то он остается относительно стабильным в течение около полугода, хотя и имеет некоторую тенденцию к снижению. Поддержание достаточного для защиты от болезни уровня циркулирующих нейтрализующих антител в течение года или, тем более, нескольких лет, маловероятно. При этом уровень В-клеток памяти остается стабильным в перспективе на годы [30]. Количество специфичных для SARS-CoV-2 Т-клеток также ожидается снижается (в среднем снижение на 50% в течение полу-

года), с одновременным нарастанием и стабилизацией уровня Т-клеток памяти. В работе J. Zuo с соавт. [15] продемонстрировано, что устойчивый Т-клеточный иммунитет к SARS-CoV-2 поддерживается и через полгода после первичной инфекции. Важно, что показана положительная корреляция между устойчивым уровнем содержания Т-клеток памяти и изначальным уровнем вирусспецифических эффекторных Т-клеток [28]. Следовательно, ответ эффекторных Т-клеток на коронавирус, измеренный в первые 3–6 мес. после перенесенной инфекции или вакцинации (определенный, например, методом ELISPOT), будет коррелировать с уровнем долгоживущих Т-клеток иммунной памяти.

То, что определенный уровень эффекторных Т-клеток является защитным от инфекции SARS-CoV-2 даже у лиц с недетектируемыми антителами (серонегативными), было недавно установлено в исследовании британских ученых [16]. В цитируемом исследовании Т-клеточные тесты ELISPOT проводились у 2672 участников. Затем участники исследования наблюдались на предмет последующего развития симптоматической инфекции COVID-19, подтвержденной ПЦР. Ни у одного из серонегативных участников с высоким Т-клеточным ответом ($n = 284$) в течение периода наблюдения не развилось симптоматической инфекции COVID-19, тогда как среди серонегативных участников с низким Т-клеточным ответом ($n = 1913$) было 20 подтвержденных случаев инфекции. Исследователями планируется дальнейшее наблюдение, позволяющее проводить обновление данных анализов по мере роста числа случаев, что может помочь получить дополнительную информацию о риске заболевания. Авторами исследования [16] был определен численный порог реактивных в отношении пептидов SARS-CoV-2

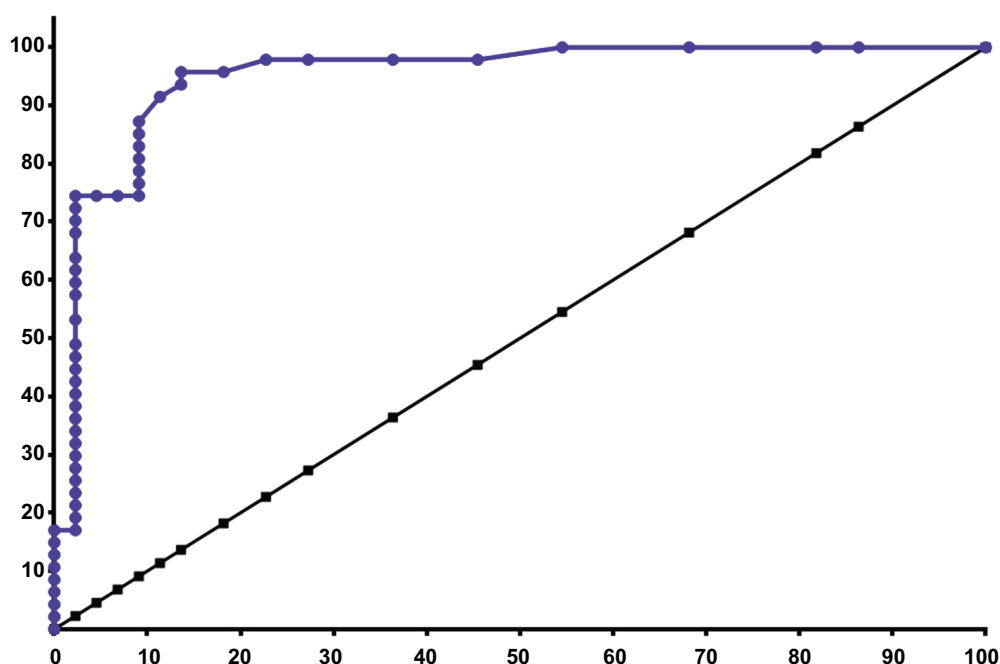


Рис. 7. Кривая ROC (Receiver Operating Characteristic — операционная характеристическая кривая), созданная на основании валидационных данных 43 реконвалесцентов с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2 (для определения чувствительности) и 44 условно здоровых людей с низким риском перенесенной инфекции (для определения специфичности). Ось абсцисс — $(1 - \text{специфичность}) \times 100$, %. Ось ординат — чувствительность, %. Порог отсечения 12 пятен был определен методом Юдена, позволившем максимально отделить эти две когорты пациентов. Чувствительность — 92%, специфичность — 89%. Площадь под кривой (AUC) — 0,95. Доверительный интервал 0,9040–0,9968.

Fig. 7. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve based on validation data for 43 convalescent patients with confirmed SARS-CoV-2 infection (sensitivity assessment) and 44 presumably healthy individuals with a low risk of previous infection (specificity assessment). X-axis— $(1 - \text{specificity}) \times 100$, %. Y-axis—sensitivity, %. The cut-off threshold of 12 spots was determined by the Youden method which allowed for maximum separation of the two patient cohorts. Sensitivity—92%, specificity—89%. Area under the curve (AUC)—0.95. Confidence interval: 0.9040–0.9968.

Т-клеток (более 12 на 250000 МКПК), который является защитным от симптоматического заболевания COVID-19.

Эти и дополнительные результаты на основе полученных данных позволяют выдвинуть следующие предположения.

1. Проведение только серологических исследований, без определения вирус-специфических Т-клеток, может привести к недооценке доли населения с более низким риском заболевания COVID-19 с выраженными симптомами.

2. Стратификация риска на индивидуальном уровне возможна с использованием Т-клеточных анализов.

3. Уровень Т-клеток, чувствительных к SARS-CoV-2, снижается с возрастом, и это может объяснять более высокую частоту и тяжесть заболевания в старшей возрастной группе.

Набор ТиграТест® SARS-CoV-2 (производства АО «ГЕНЕРИУМ») измеряет уровень содержания эффекторных Т-клеток, специфичных к 5 белкам SARS-CoV-2, являющихся наиболее частыми мишенями Т-клеточного ответа.

В настоящей работе продемонстрированы результаты апробации набора ТиграТест® SARS-CoV-2, проведенной на достаточно убедительной выборке добровольцев, как условно здоровых (контактировавших и неконтактировавших с больными COVID-19), так и перенесших подтвержденное лабораторными методами заболевание COVID-19, что позволило установить рабочие характеристики набора, подтверждающие чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов оценки Т-клеточного иммунитета в отношении SARS-CoV-2.

Подавляющее большинство результатов теста ТиграТест® SARS-CoV-2 были либо положительными, либо отрицатель-

ными. Небольшой процент результатов теста может быть пограничным (сомнительным), где большее из значений «панель АГ1 минус нулевой контроль» или «панель АГ2 минус нулевой контроль» составляет 10–12 пятен. Пограничная категория предназначена для снижения вероятности ложноположительных или ложноотрицательных результатов около пороговой точки теста ТиграТест® SARS-CoV-2. В отличие от неопределенного или недействительного результата, пограничный результат поддается клинической интерпретации и должен сопровождаться повторным тестированием, поскольку значительная часть людей может получить положительный результат при повторном тестировании. Это показано, например, для IGRA-ELISPOT тестов на туберкулезную инфекцию. В исследовании, проведенном в США, 23% субъектов с пограничным результатом теста повторно имели положительный результат, что свидетельствует о том, что пограничная категория полезна для увеличения чувствительности теста².

Следует отметить, что определенные в нашем исследовании чувствительность и специфичность теста нуждаются в уточнении в последующих клинико-лабораторных исследованиях, в которых когорты пациентов будут контролировать более строго на предмет перенесенной ранее инфекции SARS-CoV-2. С другой стороны, было показано, что Т-клеточный ответ формируется не у всех переболевших COVID-19 [24], поэтому истинная чувствительность теста может быть выше номинально определенной здесь.

При подборе пептидов, антигенов SARS-CoV-2, служащих стимулами для активации Т-клеток, встал вопрос о сте-

² <https://www.tspot.com/uk/resources/frequently-asked-questions/>

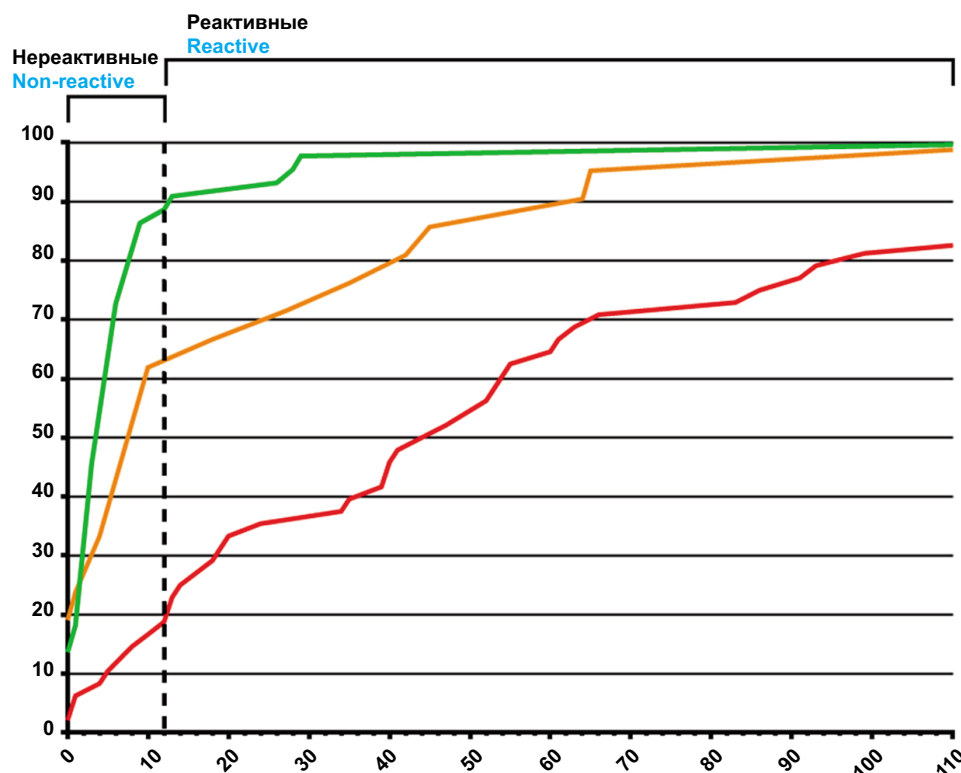


Рис. 8. Кумулятивное распределение количества пятен, выявленных анализом ТиграТест® SARS-CoV-2, с наложением порога отсечения для интерпретации результата теста (пунктирная линия, >12 пятен). — условно здоровые доноры, отрицающие перенесенное заболевание COVID-19. — лица, перенесшие заболевание COVID-19, подтвержденное лабораторными или клиническими методами. — условно здоровые доноры, заявляющие о близком или продолжительном контакте с больным COVID-19. Ось ординат — относительная частота, %. Ось абсцисс — количество пятен в лунке (на 350000 МКПК). График обрезан по оси абсцисс после 110 пятен.

Fig. 8. Cumulative distribution of the number of spots detected by the TigraTest® SARS-CoV-2 kit with an overlaid cut-off threshold for interpreting the test result (dashed line, >12 spots). — presumably healthy donors who claim no COVID-19 in the past. — previous SARS-CoV-2 infection or COVID-19 disease, confirmed by laboratory or clinical methods. — presumably healthy donors who claim a close or long-term contact with a COVID-19 patient. Y-axis—relative frequency, %. X-axis—the number of spots in the well (per 350000 PBMCs). The plot is cropped on the X-axis after 110 spots.

пени покрытия аминокислотной последовательности каждой из выбранных белковых мишеней. С одной стороны, наиболее полное покрытие теоретически поможет повысить чувствительность теста. В условиях ограниченного знания о мишенях Т-клеточного ответа на какой-либо патоген распространена практика создания 15-мерных синтетических пептидов, покрывающих 100% аминокислотной последовательности белка-антигена, причем каждый пептид на 10 аминокислотных остатков перекрывается со следующим [23]. Но при разработке набора ТиграТест® SARS-CoV-2 мы отказались от такого подхода, поскольку 100% покрытие всей последовательности выбранных белков или даже всех идентифицированных Т-клеточных эпитопов привело бы к значительному снижению специфичности теста, поскольку в таком случае выявлялись бы Т-клеточные ответы на простудные коронавирусы штаммов HKU1, 229E, OC43, NL63 [23]. Согласно нашим неопубликованным данным (материалы готовятся к публикации) Т-клеточный ответ на антигены простудных коронавирусов детектируется методом IGRA-ELISPOT у подавляющего большинства исследованных добровольцев, в частности, и у всех тех, у которых результат ТиграТест® SARS-CoV-2 был отрицательным. Следовательно, мы можем говорить о специфичности и отсутствии кросс-реактивности ТиграТест® SARS-CoV-2 с Т-клетками, специфичными для простудных коронавирусов. С другой стороны, уже были опубликованы работы, идентифицирующие репертуар Т-клеточных эпитопов у переболевших

COVID-19, более того, были найдены эпитопы, встречающиеся практически у всех перенесших инфекцию SARS-CoV-2. Поэтому для повышения специфичности набора мы исключили пептиды, обладающие перекрестной специфичностью в отношении простудных коронавирусов, которыми переболели более 70% населения [6]. В состав пептидов, представляющих мишени ТCR Т-клеток, были включены только те эпитопы, которые встречаются у подавляющего большинства переболевших COVID-19. Включение такого ограниченного набора пептидов позволило также оставить себестоимость набора ТиграТест® SARS-CoV-2 на приемлемом уровне и сделать его достаточно доступным для клинично-диагностических лабораторий. Поскольку Т-клеточный ответ на SARS-CoV-2 распространяется на большое количество разных эпитопов более чем одного вирусного белка, такое пептидное покрытие с гарантией детектирует репертуар Т-клеточного ответа как CD8⁺ эффекторных, так и CD4⁺ хелперных Т-клеток. В доказательство этого можно привести работу А. Р. Ferretti и соавт. [31], в которой авторы идентифицировали набор из 29 эпитопов, в отношении которых развивается Т-клеточный ответ у практически всех переболевших COVID-19. Важно то, что эти эпитопы соответствуют 6 наиболее часто встречающимся аллелям HLA (главного комплекса гистосовместимости). Около 90% населения США и около 85% мирового населения несет хотя бы один из этих 6 аллелей. Вероятность встречаемости хотя бы одного из этих аллелей в популяции Российской Федерации

более 90%³. В набор ТиграТест® SARS-CoV-2 входят такие же и несколько дополнительных пептидов, соответствующих эпитолам TCR, распознаваемых каждым из 6 основных аллелей HLA. Остальные пептиды в наборе соответствуют более редким в популяции аллелям. Все это дает основание полагать, что набор ТиграТест® SARS-CoV-2 обладает высокой специфичностью и достаточной чувствительностью для детекции Т-клеточного ответа на коронавирус SARS-CoV-2.

Передовой зарубежный опыт указывает на важность использования Т-клеточных тестов в борьбе с COVID-19. В ноябре 2020 г. британская рабочая группа по вакцинам (орган, созданный правительством Великобритании для оценки пригодности вакцин для использования среди населения Великобритании) сделала обязательным выявление специфических Т-клеточных ответов на SARS-CoV-2 методом IGRA-ELISPOT при испытаниях любых новых вакцин против COVID-19. Данная рабочая группа заявляет, что «понимание роли Т-клеток в борьбе с SARS-CoV-2 признается все более; определение наличия и величины любого ответа Т-клеток может дать дополнительную информацию к той, которую дают серологические исследования»⁴. Мы полагаем, что вакцины, стимулирующие только гуморальный иммунитет, могут быть недостаточно эффективны против нового коронавируса, особенно с точки зрения долговременной защиты.

Для того чтобы раскрыть истинный потенциал клинического применения набора ТиграТест® SARS-CoV-2, нужно не просто определять наличие Т-клеток, специфичных к SARS-CoV-2, а установить их количественный порог, для которого будет убедительно доказано, что он является защитным от инфекции или тяжелого течения заболевания. Это задача для будущих наблюдательных клинических исследований.

Количественное значение защитного уровня Т-клеток, определяемое одним набором ELISPOT, нельзя прямо экстраполировать на другой набор. Для того чтобы набор ТиграТест® SARS-CoV-2 трансформировался из полуколичественного инструмента, определяющего наличие или отсутствие специфических для SARS-CoV-2 Т-клеток, в прогностический, определяющий уровень иммунной защиты от симптоматической инфекции COVID-19, необходимо проведение клинико-лабораторных исследований. После этого набор ТиграТест® SARS-CoV-2 может стать высокоэффективным инструментом для исследования популяционного иммунитета и выявлению защищенных групп населения и людей, находящихся в зоне риска.

В настоящий момент мы начинаем клинико-лабораторное исследование на большой группе добровольцев, чтобы ответить на вопрос, может ли определенный уровень специфических Т-клеток (или комбинация уровня антител и Т-клеток), наблюдаемый в течение 3–6 месяцев, быть надежным маркером иммунитета, защищающего от симптоматической инфекции, пневмонии или тяжелого течения COVID-19 в течение периода наблюдения. Каков этот уровень, количественно определяемый в тесте ТиграТест® SARS-CoV-2 и выраженный в количестве пятен на 1 млн мононуклеарных периферических клеток крови. Если удастся с большой степенью надежности ответить на эти вопросы, то набор ТиграТест® SARS-CoV-2 станет действительно мощным прогностическим инструментом.

Мы также полагаем, что методика IGRA-ELISPOT и стандартизованные наборы, подобные ТиграТест® SARS-CoV-2, оценивающие наличие Т-клеточной компоненты иммунитета, помо-

гут в выработке стратегии вакцинации переболевших COVID-19 и бустирования иммунитета ранее вакцинированных.

Заключение

Разработана и апробирована тест-система для выполнения стандартизированной методики определения специфических к антигенам SARS-CoV-2 Т-клеток в периферической крови человека *in vitro*. Определены рабочие характеристики теста: референсное значение, отделяющее положительный и отрицательный результат теста, равное 12 пятнам в лунке с антигенами за вычетом отрицательного контроля; специфичность и чувствительность теста к выявлению перенесенной инфекции SARS-CoV-2 определены как 92 и 89% соответственно; сходимость теста с предшествующими результатами ПЦР тестирования на SARS-CoV-2 достигала 97,6%. Среднее значение уровня Т-клеточного ответа у переболевших COVID-19 ниже, чем у вакцинированных Гам-КОВИД-Вак добровольцев. Показано, что степень выраженности Т-клеточного ответа положительно коррелирует с тяжестью перенесенного заболевания. S-белок не является иммунодоминантной мишенью для Т-клеточного ответа.

Созданный тест на основе метода IGRA ELISPOT может специфично и воспроизводимо определять Т-клеточный ответ у перенесших инфекцию SARS-CoV-2 или вакцинированных.

Вклад авторов. Д. А. Потеряев — разработка дизайна набора ТиграТест® SARS-CoV-2, анализ литературы и биоинформатический анализ Т-клеточных эпитопов антигенов SARS-CoV-2, написание текста статьи; С. Г. Аббасова — разработка протокола выполнения анализа ELISPOT, критическое обсуждение текста статьи; П. Е. Игнатьева — оптимизация и выполнение анализа ELISPOT; О. М. Стрижакова — оптимизация и выполнение анализа ELISPOT; С. В. Колесник — оптимизация анализа ELISPOT, организация сбора биологических материалов, критическое обсуждение текста статьи; Р. А. Хамитов — критическое обсуждение, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. Dmitry A. Poteryaev—developed the design of the TigratTest® SARS-CoV-2 kit, performed bioinformatic and literature analysis of T-cell epitopes of SARS-CoV-2 antigens, and wrote the paper; Svetlana G. Abbasova—developed the ELISPOT protocol, and reviewed the paper; Polina E. Ignatyeva—optimized and performed the ELISPOT analysis; Olga M. Strizhakova—optimized and performed the ELISPOT analysis; Svetlana V. Kolesnik — optimized the ELISPOT analysis, organized the collection of biological specimens, reviewed the paper; Ravil A. Khamitov—reviewed and edited the paper.

Благодарности. Авторы благодарны коллективу группы компаний «ГЕНЕРИУМ» за помощь в организации работы. Набор для исследовательских целей ТиграТест® SARS-CoV-2 разработан ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» в рамках контракта на выполнение НИР с АО «ГЕНЕРИУМ».

Acknowledgements. The authors are grateful to the Genierium group of companies for help in organising this study. The TigratTest® SARS-CoV-2 kit was developed by IBC GENERIUM, LLC under an R&D contract with GENERIUM, JSC.

Конфликт интересов. Р. А. Хамитов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Ravil A. Khamitov is a member of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

³ http://www.allelefrequencies.net/hla6006a.asp?hla_population=3322

⁴ <https://www.globenewswire.com/news-release/2020/10/22/2112577/0/en/UK-Vaccines-Taskforce-has-Selected-Oxford-Immunotec-as-the-Sole-Supplier-of-T-cell-Testing-for-SARS-CoV-2-Specific-Responses-in-New-COVID-Vaccine-Trials.html>

Литература/References

- Melgaço JG, Azamor T, Ano Bom APD. Protective immunity after COVID-19 has been questioned: What can we do without SARS-CoV-2-IgG detection? *Cell Immunol.* 2020;353:104114. <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104114>
- Altmann DM, Boyton RJ. SARS-CoV-2 T cell immunity: specificity, function, durability, and role in protection. *Science Immunology.* 2020;5(49):eabd6160. <http://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd6160>
- Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol.* 2020;21(11):1336–45. <http://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>
- Swadling L, Maini MK. T cells in COVID-19 — united in diversity. *Nat Immunol.* 2020;21(11):1307–8. <http://doi.org/10.1038/s41590-020-0798-y>
- Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NM, Endeman H, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol.* 2020;5(48):eabd2071. <http://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd2071>
- Woldemeskel BA, Kwaa AK, Garliss CC, Laeyendecker O, Ray SC, Blankson JN. Healthy donor T cell responses to common cold coronaviruses and SARS-CoV-2. *J Clin Invest.* 2020;130(12):6631–8. <http://doi.org/10.1172/JCI143120>
- Dos Santos LA, Filho PGG, Silva AMF, Santos JVG, Santos DS, Aquino MM, et al. Recurrent COVID-19 including evidence of reinfection and enhanced severity in thirty Brazilian healthcare workers. *J Infect.* 2021;82(3):399–406. <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.01.020>
- Boyton RJ, Altmann DM. Risk of SARS-CoV-2 reinfection after natural infection. *Lancet.* 2021;397(10280):1161–3. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00662-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00662-0)
- Hansen CH, Michlmayr D, Gubbels SM, Mølbak K, Ethelberg S. Assessment of protection against reinfection with SARS-CoV-2 among 4 million PCR-tested individuals in Denmark in 2020: a population-level observational study. *Lancet.* 2021;397(10280):1204–12. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00575-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00575-4)
- Tan W, Lu Y, Zhang J, Wang J, Dan Y, Tan Z, et al. Viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19. *MedRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042382>
- Gallais F, Velay A, Nazon C, Wendling M-J, Partisani M, Sibilia J, et al. Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 associated with cellular immune response without seroconversion, France. *Emerg. Infect. Diseases.* 2021;27(1):113–21. <https://doi.org/10.3201/eid2701.203611>
- Channappanavar R, Zhao J, Perlman S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. *Immunol Res.* 2014;59(1-3):118–28. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8534-z>
- Ibarrondo FJ, Fulcher JA, Goodman-Meza D, Elliott J, Hofmann C, Hausner MA, et al. Rapid decay of anti-SARS-CoV-2 antibodies in persons with mild Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;383(11):1085–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2025179> Erratum in: *N Engl J Med.* 2020; 383(11):e74. <https://doi.org/10.1056/NEJMc200017>
- Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LF. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):363–74. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
- Zuo J, Dowell AC, Pearce H, Verma K, Long HM, Begum J, et al. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nat Immunol.* 2021;22(5):620–6. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00902-8>
- Wyllie D, Jones HE, Mulchandani R, Trickey A, Taylor-Phillips S, Brooks T, et al. SARS-CoV-2 responsive T cell numbers and anti-Spike IgG levels are both associated with protection from COVID-19: a prospective cohort study in keyworkers. *medRxiv.* 2020.11.02.20222778. <https://doi.org/10.1101/2020.11.02.20222778>
- Mandalakas AM, Highsmith HY, Harris NM, Pawlicka A, Kirchner HL. T-SPOT.TB performance in routine pediatric practice in a low TB burden setting. *Pediatr Infect Dis J.* 2018;37(4):292–7. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001792>
- Потеряев ДА, Хамитов РА, Ефимов ГА, Шустер АМ. Перспективы использования технологической платформы ELISPOT в системе противозидемических мероприятий против новой коронавирусной инфекции COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(3):146–58. [Poteryaev DA, Khamitov RA, Efimov GA, Shuster AM. Prospects for using the ELISPOT technological platform as part of anti-epidemic measures against the new coronavirus infection COVID-19. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2020;20(3):146–58 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158>
- Mallone R, Mannering S, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Belló I, Cilio CM, Wong FS, et al. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clin Exp Immunol.* 2011;163(1):33–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04272.x>
- Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strálin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell.* 2020;183(1):158–68.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>
- Shomuradova AS, Vagida MS, Sheetikov SA, Zornikova KV, Kiryukhin D, Titov A, et al. SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T cell receptors. *Immunity.* 2020;53(6):1245–57.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.004>
- Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature.* 2020;584(7821):457–62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
- Mateus J, Grifoni A, Tarke A, Sidney J, Ramirez SI, Dan JM, et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science.* 2020;370(6512):89–94. <https://doi.org/10.1126/science.abd3871>
- Reynolds CJ, Swadling L, Gibbons JM, Pade C, Jensen MP, Diniz MO, et al. Discordant neutralizing antibody and T cell responses in asymptomatic and mild SARS-CoV-2 infection. *Sci Immunol.* 2020;5(54):eabf3698. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf3698>
- Nolan S, Vignali M, Klinger M, Dines JN, Kaplan IM, Svejnova E, et al. A large-scale database of T-cell receptor beta (TCRβ) sequences and binding associations from natural and synthetic exposure to SARS-CoV-2. 2020. Preprint. *Res Sq.* 2020;rs.3.rs-51964. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-51964/v1>
- Yu J, Tostanoski LH, Peter L, Mercado NB, McMahan K, Mahrokhian SH, et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science.* 2020;369(6505):806–11. <https://doi.org/10.1126/science.abc6284>
- Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatullin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet.* 2020;396(10255):887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
- Todryk SM, Pathan AA, Keating S, Porter DW, Berthoud T, Thompson F, et al. The relationship between human effector and memory T cells measured by ex vivo and cultured

- ELISPOT following recent and distal priming. *Immunology*. 2009;128(1):83–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03073.x>
29. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021;371(6529):eabf4063. <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
30. Bauer T, Jilg W. Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination. *Vaccine*. 2006;24(5):572–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.058>
31. Ferretti AP, Kula T, Wang Y, Nguyen DMV, Weinheimer A, Dunlap GS, et al. Unbiased screens show CD8+ T cells of COVID-19 patients recognize shared epitopes in SARS-CoV-2 that largely reside outside the spike protein. *Immunity*. 2020;53(5):1095–107.e3. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.006>

Об авторах / Authors

Потеряев Дмитрий Александрович, канд. биол. наук. *Dmitry A. Poteryaev*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2695-8869>

Аббасова Светлана Георгиевна, д-р биол. наук. *Svetlana G. Abbasova*, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5841-7587>

Игнатьева Полина Евгеньевна. *Polina E. Ignatyeva*

Стрижакова Ольга Михайловна, канд. вет. наук. *Olga M. Strizhakova*, Cand. Sci. (Vet.) ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0023-0028>

Колесник Светлана Владимировна. *Svetlana V. Kolesnik*. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2398-4615>

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф. *Ravil A. Khamitov*, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

Поступила 28.05.2021
После доработки 26.07.2021
Принята к печати 03.09.2021

Received 28 May 2021
Revised 26 July 2021
Accepted 3 September 2021

Актуальная информация

Клинические исследования Всемирной организации здравоохранения новых препаратов против COVID-19

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила о начале следующего этапа организованного исследования Solidarity – Solidarity PLUS¹. Исследование будет проводиться с участием госпитализированных пациентов для испытания эффективности новых препаратов против новой коронавирусной инфекции COVID-19 в условиях стационара. Препараты (артесунат, иматиниб, инфликсимаб) отобраны независимой экспертной комиссией с учетом их потенциальной способности снижать риск летальных исходов у пациентов, госпитализированных с COVID-19.

Исследование Solidarity PLUS служит платформой для беспрецедентно широкого международного сотрудничества между государствами-членами ВОЗ. В нем участвуют тысячи исследователей из более 600 стационарных медицинских учреждений 52 стран (что на 16 стран больше, чем на первом этапе исследований). Это позволяет в ходе испытаний на основе единого протокола оценивать сразу несколько лекарственных средств, привлекая тысячи пациентов и тем самым получая достоверные данные о потенциальном (даже незначительном) воздействии препарата на показатели смертности, а также включать новые препараты в испытания и прекращать дальнейшее изучение неэффективных лекарственных средств.

Благодаря исследованию Solidarity PLUS у исследователей всего мира появляется возможность задействовать свой экспертный опыт и ресурсы в глобальных исследованиях по проблеме COVID-19.

¹ <https://www.who.int/ru/news/item/11-08-2021-who-s-solidarity-clinical-trial-enters-a-new-phase-with-three-new-candidate-drugs>

Разработка и аттестация стандартных образцов содержания фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах с учетом сопоставимости результатов, полученных методами ГЖХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии и колориметрии

О. Н. Колесникова*, О. В. Фадейкина, О. Б. Устинникова, Р. А. Волкова, А. А. Мовсесянц

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

Фенол — консервант, входящий в состав ряда иммунобиологических лекарственных препаратов, при этом методы, используемые для его количественной оценки, имеют принципиальные отличия. Актуальные требования к аккредитованным лабораториям предполагают постоянный внутрिलाбораторный контроль качества, эффективным метрологическим инструментом обеспечения которого служат стандартные образцы с аттестованным содержанием аналита. **Цель работы:** разработка и аттестация стандартных образцов содержания фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах с учетом сопоставимости результатов, полученных методами ГЖХ, ВЭЖХ, колориметрическим и спектрофотометрическим. **Материалы и методы:** разводящая жидкость для аллергенов (кандидат в стандартный образец); раствор фенола 2,5 и 5 мг/мл; раствор 2-феноксизэтанола 2,5 мг/мл. Исследования проводили с применением спектрофотометрической и колориметрической методик, а также методик, основанных на методах ГЖХ и ВЭЖХ. Результаты оценивали с применением статистических методов расчета среднего арифметического, стандартного отклонения, коэффициента вариации, дисперсионного анализа с применением критериев Стюдента и Фишера. **Результаты:** результаты определения фенола спектрофотометрическим и колориметрическим методами, а также методом ВЭЖХ статистически достоверно сопоставимы. Значение критерия Фишера (F -критерия) при сравнительной оценке равнозначных выборок ($n = 40$) — $F = 0,9343$, при критическом значении $F_{\text{крит}} = 3,96$. Для контроля стабильности определения фенола данными методами возможно применение стандартного образца, аттестованного одним из вышеуказанных методов. Результаты определения фенола методом ГЖХ статистически достоверно отличаются, $F = 17,47$ при $F_{\text{крит}} = 3,96$, что подтверждает необходимость аттестации отдельного стандартного образца. **Выводы:** аттестованы стандартный образец содержания фенола 42-28-449 для спектрофотометрического, колориметрического метода и метода ВЭЖХ с аттестованной характеристикой содержания фенола от 2,56 до 3,32 мг/мл и стандартный образец содержания фенола 42-28-451 для метода ГЖХ с аттестованной характеристикой содержания фенола от 2,92 до 3,28 мг/мл.

Ключевые слова: стандартный образец; фенол; иммунобиологические лекарственные препараты; оценка качества; высокоэффективная жидкостная хроматография; газожидкостная хроматография; внутрिलाбораторный контроль качества

Для цитирования: Колесникова ОН, Фадейкина ОВ, Устинникова ОБ, Волкова РА, Мовсесянц АА. Разработка и аттестация стандартных образцов содержания фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах с учетом сопоставимости результатов, полученных методами ГЖХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии и колориметрии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(3):193–199. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-193-199>

***Контактное лицо:** Колесникова Оксана Николаевна; kolesnikovaO@expmed.ru

Development and certification of reference standards for phenolic content in biologicals, based on comparison of results obtained by GLC, HPLC, spectrophotometric, and colorimetric methods

O. N. Kolesnikova*, O. V. Fadeikina, O. B. Ustinnikova, R. A. Volkova, A. A. Movsesyants

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

Phenol is used as a preservative in a number of biological products. Methods that are used for quantitative determination of phenol differ a lot. Current requirements for accredited laboratories include continuous internal quality control. Reference standards with a certified content of the analyte are an effective metrological tool for ensuring such control. **The aim of the study** was to develop and certify reference standards for phenolic content in biological products, based on comparison of results obtained by GLC, HPLC, spectrophotometric, and colorimetric methods. **Materials and methods:** diluent for allergens by (candidate reference standard), 2.5 and 5 mg/mL phenol solutions, and 2.5 mg/mL 2-phenoxyethanol solution were used in the study. The experiments were performed using spectrophotometric, colorimetric, HPLC, and GLC procedures. The statistical analysis of results included calculation of the arithmetic mean, standard deviation, coefficient of variation, and analysis of variance with Student's t -test and Fisher's F -test. **Results:** the results of phenolic content determination by the spectrophotometric, colorimetric, and HPLC methods were statistically comparable. The F value obtained for equal sample sizes ($n = 40$) was $F = 0.9343$, given the critical value $F_{\text{crit}} = 3.96$. A reference standard certified by one of these methods can be used to control the consistency of phenol determination by a relevant method.

The results of phenolic content determination by the GLC method showed statistically significant differences: $F = 17.47$, given $F_{crit} = 3.96$, which demonstrated the need for certification of another reference standard. **Conclusions:** two reference standards were certified in the study: reference standard 42-28-449 with the certified phenolic content of 2.56–3.32 mg/mL, to be used with the spectrophotometric, colorimetric, and HPLC methods; and reference standard 42-28-451 with the certified phenolic content of 2.92–3.28 mg/mL, to be used with the GLC method.

Key words: reference standard; phenol; biological products; quality control; high-performance liquid chromatography; gas-liquid chromatography; laboratory quality control

For citation: Kolesnikova ON, Fadeikina OV, Ustinnikova OB, Volkova RA, Movsesyants AA. Development and certification of reference standards for phenolic content in biologicals, based on comparison of results obtained by GLC, HPLC, spectrophotometric, and colorimetric methods. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(3):193–199. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-193-199>

*Corresponding author: Oksana N. Kolesnikova; kolesnikovaO@expmed.ru

Производство иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) в силу ряда специфических особенностей предполагает использование антимикробных агентов — консервантов¹. Одним из наиболее часто используемых консервантов является фенол². Фенол входит в состав инфекционных и неинфекционных аллергенов, моно- и поливалентных полисахаридных вакцин, при этом его содержание колеблется в диапазоне от 1,5 до 4,0 мг/мл в зависимости от препарата. В соответствии с отечественными и зарубежными фармакопейными требованиями необходимо включение показателя «Фенол» в спецификацию на готовую форму, что предусматривает подтверждение соответствия количества фенола установленным значениям (норме)³.

Для количественной оценки фенола в ИЛП применяют фармакопейные методики колориметрического⁴ и спектрофотометрического⁵ определения и их модификации, а также новые методики, основанные на методах высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)⁶ и газожидкостной хроматографии (ГЖХ) [1, 2]. Предпочтение методик хроматографического анализа обусловлено их большей специфичностью, возможной благодаря предварительному разделению компонентов испытуемого образца, что особенно актуально в случае ИЛП, обладающих сложной многокомпонентной матрицей [3–10].

Актуальные требования к аккредитованным лабораториям, изложенные в ГОСТ Р ИСО 17025-2019, предполагают посто-

янный внутрилабораторный контроль качества как на уровне оперативного контроля, так и на уровне оценки стабильности аналитической работы⁷.

Эффективным метрологическим инструментом обеспечения внутрилабораторного контроля качества являются стандартные образцы (СО), предназначенные для контроля стабильности определения содержания анализируемого компонента. Аттестованной характеристикой таких СО является установленный диапазон значений содержания анализируемого компонента. Соответствие данному диапазону подтверждает правильность выполнения анализа (оперативный контроль), а колебания значений внутри диапазона, установленные в ходе ретроспективного анализа, иллюстрируют стабильность аналитической работы. Кроме того, применение СО позволяет осуществлять проведение межлабораторных сличительных испытаний, обеспечивая возможность оценки сопоставимости результатов. Это особенно важно при внедрении вновь разработанных или модифицированных методик для обеспечения соответствия современным требованиям системы менеджмента качества (СМК) к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий⁸.

Таким образом, аттестация СО контроля стабильности определения фенола (далее — СО содержания фенола) в ИЛП представляется актуальным направлением исследования. Однако разнообразие методик определения требует предвари-

¹ Points to consider on the reduction elimination or substitution of thiomersal in vaccines. EMA; 2001.

² Фармакопейная статья 3.3.1.0023.15 Туберкулин очищенный (ППД) (аллерген туберкулезный очищенный). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0001.15 Аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0012.15 Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Аллерген из пыльцы тимотефевки луговой для диагностики и лечения. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=dfe1a94d-86f0-4aa7-9988-101ab499c7ce&t=

³ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0028.18 Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

2.5.15 Phenol in immunosera and vaccines. European Pharmacopoeia 9th ed.; 2016.

Фармакопейная статья 3.3.1.0001.15 Аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0012.15 Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0013.15 Вакцина дизентерийная против шигелл Зонне. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0001.15 Аллергены. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ 2.5.15 Phenol in immunosera and vaccines. European Pharmacopoeia 9th ed.; 2016.

⁵ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0028.18 Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁶ Там же.

⁷ ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

⁸ ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

РМГ 76-2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

ГОСТ Р ИСО 5725-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений.

тельной оценки сопоставимости результатов, полученных с их применением, для возможности установления единой приемлемой аттестованной характеристики СО.

Цель работы — разработка и аттестация стандартных образцов содержания фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах с учетом сопоставимости результатов, полученных методами ГЖХ, ВЭЖХ, колориметрическим и спектрофотометрическим.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- выбор кандидата в СО содержания фенола в ИЛП;
- оценка сопоставимости результатов определения фенола с применением методов колориметрического и спектрофотометрического анализа, а также методов ВЭЖХ и ГЖХ;
- аттестация СО содержания фенола.

Материалы и методы

Материалы:

- кандидат в СО — разводящая жидкость для неинфекционных аллергенов (АО «НПО «Микроген», Россия, серия 121); состав разводящей жидкости: фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением полисорбата-80 (около 0,005 мкг/мл) и фенола (от 2 до 4 мг/мл);
- раствор фенола с концентрацией около 2,5 мг/мл (с учетом поправки на чистоту реактива и массу навески), приготовленный по точной навеске фенола (Fisher Scientific, кат. № A9311);
- рабочий раствор для построения калибровочной характеристики (калибровочный стандартный раствор): раствор фенола с концентрацией около 5 мг/мл (с учетом поправки на чистоту реактива и массу навески), приготовленный по точной навеске фенола (Fisher Scientific, кат. № A9311);
- внутренний стандарт: раствор 2-феноксизанола с концентрацией около 2,5 мг/мл, приготовленный по точной навеске 2-феноксизанола (Sigma-Aldrich, кат. № 77699).

Оборудование:

- хроматограф Agilent 7890B (Agilent Technologies, США) с пламенно-ионизационным детектором, автоматическим пробоотборником, программируемым термостатом колонки, узлом ввода проб с делением потока, электронной системой управления газовыми потоками, компьютерной системой сбора и обработки данных;
- хроматографическая капиллярная колонка DB-WAX 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм, неподвижная фаза — полиэтиленгликоль (Agilent Technologies, США, кат. № 122–7032 E);
- спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония) двухлучевой, спектральный диапазон 190–1100 нм;
- высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, США) с УФ-детекцией.

Методы

Метод ГЖХ с использованием колонки DB-WAX (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) и следующих условий хроматографирования: температура инжектора 250 °С; деление потока 40:1; объем пробы 0,5 мкл; газ-носитель — гелий; режим — постоянное давление; скорость потока — 1,4 мл/мин; температурная программа печи: начальная температура 160 °С, выдержка 3 мин, повышение температуры до 200 °С со скоростью 40 °С/мин, выдержка 0,6 мин, повышение температуры до 220 °С со скоростью 40 °С/мин, время анализа 7,133 мин; температура детектора 250 °С [1, 2].

Спектрофотометрический метод определения фенола, основанный на способности фенола поглощать ультрафиолетовый (УФ) свет при длине волны 269 нм (в соответствии с ОФС Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах)⁹.

Колориметрический метод определения фенола, основанный на способности фенола образовывать окрашенный комплекс с 4-аминоантипирином в присутствии калия феррицианида, детектируемый при длине волны 546 нм (в соответствии с монографией 2.5.15 Европейской фармакопеи)¹⁰.

Метод ВЭЖХ, основанный на выделении фенола при помощи обращенно-фазовой хроматографии и детектировании в УФ-свете при длине волны 270 нм (в соответствии с ОФС Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах)¹¹. Хроматографирование проводили в изократическом режиме с использованием колонки с носителем на основе октадецилсиликагеля (Symmetry C18 размер частиц 5 мкм, 3,9 мм × 150 мм, Waters N WAT046980) при комнатной температуре. В составе подвижной фазы применяли смесь ацетонитрила с уксусной кислотой (ацетонитрил:0,5% раствор уксусной кислоты, в соотношении 1:4). Время хроматографирования 12 мин.

Для обработки полученных результатов использовали статистические методы расчета среднего арифметического, стандартного отклонения, коэффициента вариации, дисперсионный анализ с помощью вычисления критерия Стьюдента и критерия Фишера [11].

Результаты и обсуждение

Выбор материала для СО содержания фенола, порядок аттестации и установления значений аттестованных характеристик СО проводили, руководствуясь рекомендациями ВОЗ по изготовлению биологических стандартных образцов с учетом специфики биологических препаратов¹² [12–16].

При выборе кандидата в СО руководствовались стабильностью аналита при хранении в соответствующих условиях и его исходной концентрацией. Поскольку фенол обладает выраженной кислотностью и подвергается гидрированию и окис-

⁹ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0028.18 Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹⁰ 2.5.15 Phenol in immunosera and vaccines. European Pharmacopoeia 9th ed.; 2016.

¹¹ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0028.18 Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹² WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines. WHO/IVB/11/03; 2011.

Recommendations for the preparation and establishment of international and other biological reference standards. Annex 2. WHO Technical Report Series No. 932; 2004.

Волкова РА. Система контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов химическими и иммунохимическими методами: дис. ... д-ра биол. наук. М.; 2009.

¹³ Приказ Минздрава России от 13.11.1996 № 377 «Об утверждении Инструкции по организации хранения в аптечных учреждениях различных групп лекарственных средств и изделий медицинского назначения».

Химическая энциклопедия. Т. 3. М.; 1992.

лению, его стабильность в растворе может обеспечиваться герметичностью упаковки и соблюдением требований к условиям хранения¹³. Выбранная в качестве кандидата в СО фенол-содержащая жидкость, используемая в качестве разводящей жидкости для препаратов аллергенов, удовлетворяет данным требованиям. Разводящая жидкость выпускается в виде ампулированного раствора с установленным сроком годности, концентрация фенола в разводящей жидкости (от 2 до 4 мг/мл) сопоставима с содержанием фенола в иммунобиологических препаратах (от 1,5 до 4 мг/мл).

Одним из основных требований к кандидату в СО содержания фенола является стабильность содержания определяемого вещества. Стабильность содержания фенола в образцах кандидата в СО оценивали методом естественного старения, сравнивая репрезентативные выборки результатов количественного определения фенола методом ГЖХ, полученные с разницей в два года, объемы выборок $n = 40$. Статистическую значимость различий результатов, полученных за два периода, определяли с использованием критерия Стьюдента. В результате расчетов получены следующие величины средних значений (X_1 и X_2) и стандартных отклонений первой и второй выборки соответственно: $X_1 = 3,11$ мг/мл ($n = 40$), $S_1 = 0,06$ мг/мл и $X_2 = 3,10$ мг/мл ($n = 40$), $S_2 = 0,09$ мг/мл. Расчетное значение критерия Стьюдента при оценке достоверности различия полученных величин — 0,571, что меньше критического табличного значения — 2,021 ($n = 40$; $\alpha = 0,05$). Это означает, что между двумя группами данных нет статистически значимых различий с вероятностью 95%. Полученный результат свидетельствует о стабильности значения концентрации фенола в образцах кандидата в СО содержания фенола в течение двух лет.

Необходимым условием для выбора кандидата в СО содержания фенола является оценка однородности дозирования аналита в первичной упаковке. Однородность дозирования в образцах кандидата в СО содержания фенола оценивали в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации путем расчета показателя приемлемости результатов испытаний (AV)¹⁴. Полученное значение первого показателя приемлемости 8,4% не превышает максимально допустимого значения L1, равного 15,0%, относительное стандартное отклонение значений полученной выборки $RSD = 2,5\%$, что свидетельствует о равномерности дозирования фенола в образцах кандидата в СО.

Результаты предварительных испытаний позволили сделать вывод о возможности применения выбранного материала для аттестации в качестве стандартного образца содержания фенола при определении фенола в ИЛП.

Анализ возможности применения СО, аттестованного спектрофотометрическим методом, для колориметрического метода и метода ВЭЖХ

Традиционные методики количественного определения фенола (на основе спектрофотометрического, колориметрического методов и метода ВЭЖХ) имеют сопоставимые точностные валидационные характеристики [1]. Возможность использования для разных методик СО содержания фенола с аттестованной характеристикой, полученной спектрофотометрическим методом, может быть подтверждена сопоставимостью результатов, полученных спектрофотометрическим, колориметрическим методом и методом ВЭЖХ.

Сопоставимость результатов, полученных спектрофотометрическим и колориметрическим методами, была подтверждена ранее [1] на основании результатов однофакторного дисперсионного анализа с расчетом F -критерия. В ходе анализа массивов данных, полученных при исследовании 13 образцов препаратов ИЛП в условиях внутрилабораторной воспроизводимости, значения F -критерия для колориметрического и спектрофотометрического методов составили 1,05073 и 0,8313 соответственно, что существенно ниже критического значения — 3,26 (при доверительной вероятности 0,95). Полученные значения F -критерия свидетельствуют об отсутствии статистически значимых отличий между массивами данных [1].

Таким образом, оценку сопоставимости проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с вычислением F -критерия (табл. 1).

Как следует из данных, представленных в таблице 1, расчетное значение F -критерия $F = 0,9343$ существенно ниже табличного значения $F_{\text{крит}} = 3,96$, что свидетельствует об удовлетворительной сопоставимости результатов и отсутствии статистически значимых различий в результатах определения фенола.

Установление аттестованной характеристики СО содержания фенола спектрофотометрическим методом проводили на 40 образцах в условиях промежуточной прецизионности. Среднее значение составило 2,94 мг/мл, стандартное отклонение полученных результатов — 0,19 мг/мл. Значение аттестованной характеристики СО, выраженное в виде предела допустимых значений неопределенности $\pm 2S$, — от 2,56 до 3,32 мг/мл. Образцу присвоен номер 42-28-449.

Средние значения содержания фенола в СО 42-28-449, полученные методом ВЭЖХ и колориметрическим методом, составили 2,9 мг/мл ($n = 40$) и 2,8 мг/мл ($n = 10$) соответственно.

На основании данных результатов, а также результатов о сопоставимости методик, сделан вывод о возможности применения СО 42-28-449 для колориметрического метода и метода ВЭЖХ.

Аттестация СО содержания фенола методом ГЖХ

Методика ГЖХ предполагает применение СО содержания фенола, аттестованная характеристика которого соответствует ее точностным характеристикам [1, 2]. Для оценки возможности применения СО 42-28-449 для подтверждения стабильности измерений методикой ГЖХ оценивали сопоставимость результатов определения фенола спектрофотометрическим методом, методами ВЭЖХ и ГЖХ (табл. 2).

Как следует из таблицы 2, правильность, выраженная в виде среднего арифметического значения определяемой величины, удовлетворительна и не имеет значимых различий для всех методик. В то время как прецизионность методики ГЖХ, выраженная в виде стандартного отклонения и коэффициента вариации, отличается от прецизионности остальных методик приблизительно в 2 раза.

Статистическую значимость данных отличий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (табл. 2), расчетное значение коэффициента Фишера $F = 17,47$ существенно выше табличного значения $F_{\text{крит}} = 3,07$, что свидетельствует о несопоставимости результатов.

Таким образом, применение СО 42-28-449 для стандартизации методики на основе метода ГЖХ неприемлемо.

¹⁴ Общая фармакопейная статья 1.4.2.0008.18 Однородность дозирования. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Таблица 1. Оценка сопоставимости результатов определения фенола спектрофотометрическим (СФ) методом и методом ВЭЖХ
Table 1. Comparability evaluation of phenol determination by the spectrophotometric (SPh) and HPLC methods

Статистические характеристики Statistics		Методы определения фенола Phenol determination methods	
		СФ SPh	ВЭЖХ HPLC
Среднее значение результатов определения концентрации фенола в СО, мг/мл ($n = 40$) Mean of phenol concentration in the reference standard, mg/mL ($n = 40$)	$\bar{X}_{\text{ср}}$	2,94	2,90
Стандартное отклонение, мг/мл Standard deviation, mg/mL	S	0,19	0,18
Дисперсия Variance	S^2	0,0361	0,0324
Среднее значение результатов определения концентрации фенола в СО, мг/мл по двум выборкам ($n = 40$) Mean of phenol concentration in the reference standard, mg/mL, for two samples ($n = 40$)	$\bar{X}_{\text{ср}}$	2,92	
Стандартное отклонение средних значений, мг/мл Standard deviation of the mean, mg/mL	$S_{\text{ср}}$	0,028284	
Дисперсия средних Variance of the mean	S^2	0,000799984656	
Внутригрупповая дисперсия Within-group variance	$S_{\text{внут}}$	0,03425	
Межгрупповая дисперсия Between-group variance	$S_{\text{меж}}$	0,03199938624	
Значение критерия Фишера F value	F	0,9343	
Межгрупповое число степеней свободы Number of degrees of freedom for between-group variance	$V_{\text{меж}}$	1	
Внутригрупповое число степеней свободы Number of degrees of freedom for within-group variance	$V_{\text{внут}}$	78	

Таблица 2. Оценка сопоставимости результатов определения фенола спектрофотометрическим методом, методами ВЭЖХ и ГЖХ и их точностные характеристики
Table 2. Comparability evaluation of phenol determination by the spectrophotometric (SPh), HPLC, and GLC methods, and accuracy of the results

Статистические характеристики Statistics		Методы определения фенола Phenol determination methods		
		ГЖХ GLC	СФ SPh	ВЭЖХ HPLC
Среднее значение результатов определения концентрации фенола в СО, мг/мл ($n = 40$) Mean of phenol concentration in the reference standard, mg/mL ($n = 40$)	$\bar{X}_{\text{ср}}$	3,10	2,94	2,90
Стандартное отклонение, мг/мл Standard deviation, mg/mL	S	0,09	0,19	0,18
Относительное стандартное отклонение, % Relative standard deviation	RSD	2,9	6,46	6,21
Дисперсия Variance	S^2	0,00839	0,0361	0,0324
Среднее значение результатов определения концентрации фенола в СО, мг/мл по трем выборкам ($n = 40$) Mean of phenol concentration in the reference standard, mg/mL, for three samples ($n = 40$)	$\bar{X}_{\text{ср}}$	2,98		
Стандартное отклонение средних значений, мг/мл Standard deviation of the mean, mg/mL	$S_{\text{ср}}$	0,1058		
Дисперсия средних Variance of the mean	S^2	0,01119364		
Внутригрупповая дисперсия Within-group variance	$S_{\text{внут}}$	0,02563		
Межгрупповая дисперсия Between-group variance	$S_{\text{меж}}$	0,4477456		
Значение критерия Фишера F value	F	17,47		
Межгрупповое число степеней свободы Number of degrees of freedom for between-group variance	$V_{\text{меж}}$	2		
Внутригрупповое число степеней свободы Number of degrees of freedom for within-group variance	$V_{\text{внут}}$	117		
Табличное значение критерия Фишера (уровень значимости $\alpha = 0,05$) Tabular F value (significance level $\alpha = 0,05$)	$F_{\text{крит}}$	3,07		

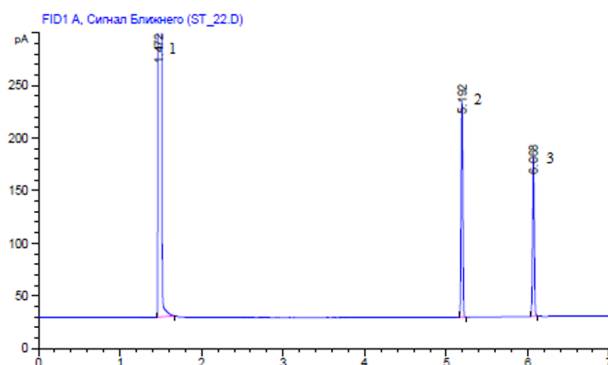


Рис. 1. Хроматограмма раствора фенола (по оси абсцисс — время удерживания, мин; по оси ординат — величина аналитического сигнала, pA). 1 — пик растворителя; 2 — хроматографический пик, соответствующий фенолу; 3 — хроматографический пик, соответствующий 2-феноксизтанолу.

Fig. 1. Chromatogram of the phenol solution (X-axis—retention time, min; Y-axis—response, pA). 1—solvent peak; 2—chromatographic peak due to phenol; 3—chromatographic peak due to 2-phenoxyethanol.

Далее провели аттестацию СО содержания фенола методикой ГЖХ, предварительно оценив возможное влияние состава кандидата в СО на результаты анализа, путем сравнения типичных хроматограмм раствора фенола 2,5 мг/мл (рис. 1) и кандидата в СО (рис. 2).

Отсутствие посторонних пиков, разрешение и совпадение времен удерживания пиков фенола (5,192 и 5,191 мин) и пиков внутреннего стандартного образца 2-феноксизтанол (6,068 и 6,067 мин) позволяют сделать вывод об отсутствии неспецифического влияния вспомогательных веществ, входящих в состав кандидата в СО, на результаты определения фенола.

Установление аттестованной характеристики СО методом ГЖХ проводили на 40 образцах в условиях промежуточной прецизионности. Среднее значение составило 3,10 мг/мл, стандартное отклонение полученных результатов — 0,09 мг/мл. Значение аттестованной характеристики СО содержания фенола, выраженное в виде предела допустимых значений неопределенности $\pm 2S$, — от 2,92 до 3,28 мг/мл. Образцу присвоен номер 42-28-451.

Заключение

Результаты определения фенола спектрофотометрическим и колориметрическим методами, а также методом ВЭЖХ статистически достоверно сопоставимы. Таким образом, для контроля стабильности определения фенола возможно применение стандартного образца, аттестованного одним из вышеуказанных методов. Результаты определения фенола методом ГЖХ статистически достоверно отличаются от результатов, полученных вышеуказанными методами, что подтверждает необходимость аттестации отдельного стандартного образца. Таким образом, аттестованы фармакопейный¹⁵ стандартный образец содержания фенола 42-28-449 (для спектрофотометрического, колориметрического метода и метода ВЭЖХ) и фармакопейный стандартный образец содержания фенола 42-28-451 (для метода ГЖХ).

Вклад авторов. О. Н. Колесникова — формирование задач исследования, выполнение экспериментальных работ и статистическая обработка данных, обсуждение результа-

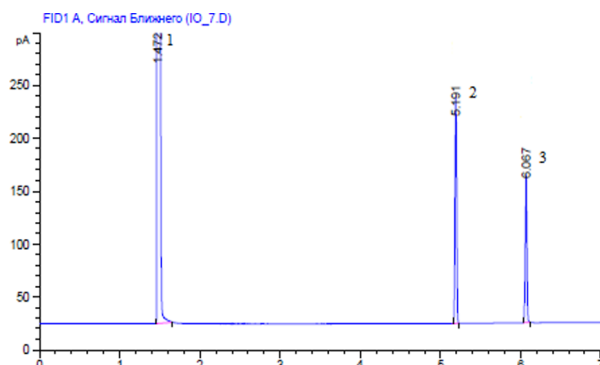


Рис. 2. Хроматограмма кандидата в СО (по оси абсцисс — время удерживания, мин; по оси ординат — величина аналитического сигнала, pA). 1 — пик растворителя; 2 — хроматографический пик, соответствующий фенолу; 3 — хроматографический пик, соответствующий 2-феноксизтанолу.

Fig. 2. Chromatogram of the candidate reference standard (X-axis—retention time, min; Y-axis—response, pA). 1—solvent peak; 2—chromatographic peak due to phenol; 3—chromatographic peak due to 2-phenoxyethanol.

тов исследования, формирование документации на стандартные образцы, написание текста рукописи; **О. В. Фадейкина** — проверка документации на стандартные образцы; **О. Б. Устинникова** — идея и дизайн исследования, обсуждение результатов исследования, проверка документации на стандартные образцы, редактирование и дополнение текста рукописи; **Р. А. Волкова** — обсуждение результатов исследования, проверка и согласование документации на стандартные образцы, редактирование текста рукописи; **А. А. Мовсесянц** — окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. Oksana N. Kolesnikova—formulation of the objectives, carrying out experiments, statistical analysis of the results, discussion of the study results, preparation of documentation for the reference standards, writing of the text; Olga V. Fadeikina—revision of the documentation for the reference standards; Olga B. Ustinnikova—elaboration of the study idea, and design, discussion of the study results, revision of the documentation for the reference standards, revision of the text of the paper, writing of some parts of the paper; Rauza A. Volkova—discussion of the study results, revision and approval of the documentation for the reference standards, editing of the text; Artashes A. Movsesyants—approval of the final version of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 121022000147-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Конфликт интересов. А. А. Мовсесянц является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Artashes A. Movsesyants is a member of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

¹⁵ Приказ Минздрава России № 202 от 20.03.2020 «О метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения».

Литература/References

1. Колесникова ОН, Рунова ОБ, Устинникова ОБ. Разработка и валидация методики количественного определения фенола методом газожидкостной хроматографии в биологических лекарственных препаратах. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(5):60–4. [Kolesnikova ON, Runova OB, Ustinnikova OB. Development and validation of gas-liquid chromatography method for quantitative determination of phenol in biological medicinal products. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(5):60–4 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-5-60-64>
2. Колесникова ОН, Устинникова ОБ, Рунова ОБ. Способ количественного определения фенола методом газожидкостной хроматографии в биологических лекарственных препаратах. Патент Российской Федерации № 2693518; 2019. [Kolesnikova ON, Ustinnikova OB, Runova OB. Method for quantitative determination of phenol in biological medicinal preparations by gas-liquid chromatography. Patent of the Russian Federation No. 2693518; 2019 (In Russ.)]
3. Dettmer-Wilde K, Engewald W. *Practical Gas Chromatography: a Comprehensive Reference*. Berlin: Springer, 2014.
4. Berezkin VG. *Chemical Methods in Gas Chromatography*. Journal of Chromatography Library. V. 24. Amsterdam; New York: Elsevier Scientific Publishers; 1983.
5. Parris NA. *Instrumental Liquid Chromatography*. Journal of Chromatography Library. V. 27. Amsterdam; New York: Elsevier Science Publishers; 1984.
6. Хайвер К, ред. *Высокоэффективная газовая хроматография*. М.: Мир; 1993. [Hyver K, ed. *High resolution liquid chromatography*. Hewlett-Packard Co.; 1989 (In Russ.)]
7. Bruner F. *The Science of Chromatography*. Journal of Chromatography Library. V. 32. Amsterdam; New York: Elsevier, 1985.
8. Guiochon G, Guillemin CL. *Quantitative Gas Chromatography for Laboratory Analyses and On-line Process Control*. Journal of Chromatography Library. V. 42. Amsterdam; New York: Elsevier; 1988.
9. Rotzsche H. *Stationary Phases in Gas Chromatography*. Journal of Chromatography Library. V. 48. Amsterdam; New York: Elsevier; 1991.
10. Hanai T. *Liquid Chromatography in Biomedical Analysis*. Journal of Chromatography Library. V. 50. Amsterdam; New York: Elsevier; 1991.
11. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1998. [Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994]
12. Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Волкова РА, Фадейкина ОБ. Проблема аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013;(2):28–32. [Bondarev VP, Borisevich IV, Volkova RA, Fadeikina OV. Industry reference standards certification for the control of medical immunobiological preparations. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2013;(2):28–32 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2013-0-2>
13. Фадейкина ОБ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. [Fadeikina OV, Volkova RA. Elaboration of the certification procedure for biological reference standards. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017;51(8):44–50 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50>
14. Волкова РА. Проблемы метрологического обеспечения методик оценки качества иммунобиологических препаратов, в кн.: *I Международная конференция «Стандартные образцы в измерениях и технологиях»*. Сборник трудов. Ч. 1. Екатеринбург; 2013. С. 88–90. [Volkova RA. Problems metrological support of quality assessment methods of immunobiological drugs. In *international conference "Reference materials and measurement technology"*. Proceedings. Part 1. Ekaterinburg; 2013. P. 88–90 (In Russ.)]
15. Волкова РА. Методики контроля или методики испытаний — к вопросу о метрологическом обеспечении аналитических методик. *Справочник заведующего КДЛ*. 2013;(4):4–9. [Volkova RA. Methods of control or testing procedures — the issue of metrological support of analytical methods. *Spravochnik zaveduyuschego KDL*. 2013;(4):4–9 (In Russ.)]
16. Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Климов ВИ, Шеремьякина ТБ, Яшкир ВА, Бармин АВ. Современные подходы к разработке стандартных образцов для оценки качества фармацевтических субстанций. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(11):54–6. [Merkulov VA, Sakanyan EI, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkir VA, Barmin AV. Modern approaches to development of reference substances for evaluation of the quality of pharmaceuticals. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(11):54–6 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2015-49-11-54-56>

Об авторах / Authors

Колесникова Оксана Николаевна. Oksana N. Kolesnikova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8664-5800>

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук. Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

Устинникова Ольга Борисовна, канд. биол. наук. Olga B. Ustinnikova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук. Rauza A. Volkova, Dr. Sci. (Biol.). <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф. Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Поступила 15.03.2021

После доработки 24.06.2021

Принята к публикации 03.09.2021

Received 15 March 2021

Revised 24 June 2021

Accepted 3 September 2021

Разработка технологии приготовления ферментативного гидролизата отработанных куриных эмбрионов

Ю. С. Овсянников, М. С. Дурсенев*

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Вятский государственный агротехнологический университет», Октябрьский проспект, д. 133, Киров, 610017, Российская Федерация

Перспективным направлением в биотехнологии является разработка технологий изготовления питательных основ микробиологических питательных сред (ПС), в которых в качестве белкового сырья используют отходы производства, как правило, недефицитных и непищевых продуктов. Сотрудниками Вятского государственного агротехнологического университета предлагается использовать для этих целей непищевое вторичное сырье — отработанные куриные эмбрионы (ОКЭ), которые после извлечения вирусосодержащей аллантоисной жидкости являются отходами производства противогриппозных препаратов. **Цель работы:** разработка технологии приготовления ферментативного гидролизата ОКЭ и оценка ростовых свойств плотной ПС на его основе с использованием тест-штаммов *Escherichia coli* M-17 и *Pseudomonas alcaligenes* IP-1. **Материалы и методы:** предложены методические подходы получения ферментативного гидролизата отработанных куриных эмбрионов (ФГОКЭ), обоснованы параметры процесса гидролиза. Разработанный ФГОКЭ оценен по физико-химическим показателям: pH; содержание аминного азота, общего азота, натрия хлорида, степень расщепления белка. Ростовые свойства ПС, приготовленной на основе разработанного гидролизата, исследовали с использованием тест-штаммов *E. coli* M-17 и *Ps. alcaligenes* IP-1. **Результаты:** экспериментально показана возможность ферментативного гидролиза ОКЭ. Изучены физико-химические показатели приготовленных серий ФГОКЭ. Показана возможность использования приготовленного гидролизата в составе плотной ПС для выращивания выбранных тест-штаммов. **Выводы:** обоснованы оптимальные технологические параметры ферментативного гидролиза ОКЭ: pH ($7,6 \pm 0,3$), продолжительность (48 ± 2) ч, температура (49 ± 1) °C; оптимизирована загрузка компонентов гидролиза: массовая доля субстрата 500 г/л, массовая доля гидролизующего агента 100 г/л. ФГОКЭ по своим физико-химическим показателям пригоден для конструирования микробиологических сред; плотная ПС на основе экспериментального гидролизата стабильно обеспечивает рост тест-штаммов *E. coli* M-17 и *Ps. alcaligenes* IP-1 с типичными свойствами; ростовые свойства экспериментальной среды сопоставимы с таковыми ПС, приготовленной на основе мясо-пептонного бульона.

Ключевые слова: технология; куриные эмбрионы; непищевое сырье; питательная среда; ферментативный гидролизат; ферментативный гидролиз

Для цитирования: Овсянников ЮС, Дурсенев МС. Разработка технологии приготовления ферментативного гидролизата отработанных куриных эмбрионов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(3):200–205. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-200-205

* Контактное лицо: Дурсенев Максим Сергеевич; Maks.Xitman@mail.ru

Development of the technology for preparation of enzymatic hydrolysate of waste chick embryos

Yu. S. Ovsyannikov, M. S. Dursenev*

Vyatka State Agrotechnological University, 133 Oktyabrsky Avenue, Kirov 610017, Russian Federation

The development of technologies for preparation of protein nutritional bases for microbiological nutrient media, from production waste of mainly readily available or non-food products, is a promising area in biotechnology. Researchers of Vyatka State Agrotechnological University assume that non-food secondary raw materials, such as waste chick embryos (WCEs) used in the production of anti-influenza products, could be used for these purposes, after removal of the virus-containing allantoic fluid. **The aim of the study** was to develop a technology for preparation of WCE enzymatic hydrolysate (WCEEH), and to evaluate growth properties of the hydrolysate-based solid nutrient medium, using *Escherichia coli* M-17 and *Pseudomonas alcaligenes* IP-1 test strains. **Materials and methods:** the authors offer methodological approaches to obtaining WCEEH and substantiate hydrolysis parameters. The obtained WCEEH was characterised in terms of physico-chemical properties: pH, amine nitrogen, total nitrogen, sodium chloride, degree of protein cleavage. The growth properties of the hydrolysate-based nutrient medium were studied using *E. coli* M-17 and *Ps. alcaligenes* IP-1 test strains. **Results:** the experiments demonstrated the feasibility of performing enzymatic hydrolysis of WCEs, and assessed physico-chemical properties of the prepared WCEEH batches. The study demonstrated the possibility of using the prepared hydrolysate as a component of solid nutrient media for growing the selected test strains. **Conclusions:** the study substantiated the optimal technological parameters for WCE enzymatic hydrolysis: pH (7.6 ± 0.3), duration (48 ± 2 h), temperature (49 ± 1) °C. The loading of hydrolysis components was optimised: mass fraction of the substrate—500 g/L, mass fraction of the hydrolysing agent—100 g/L. The physico-chemical properties of WCEEH make it suitable for preparation of microbiological media; the hydrolysate-based solid nutrient medium consistently ensures the growth of *E. coli* M-17 and *Ps. alcaligenes* IP-1 test strains with standard properties. The growth properties of the experimental medium are comparable to those of the meat-peptone broth-based nutrient medium.

Key words: technology; chick embryos; non-food raw materials; growth medium; enzymatic hydrolysate; enzymatic hydrolysis

For citation: Ovsyannikov YuS, Dursenev MS. Development of the technology for preparation of enzymatic hydrolysate of waste chick embryos. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(3):200–205. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-200-205>

***Corresponding author:** Maksim S. Dursenev; Maks.Xitman@mail.ru

Получение белковых гидролизатов как источника аминокислот и пептидов нашло свое применение в биотехнологии для приготовления питательных основ (ПО), входящих в состав микробиологических питательных сред (ПС), которые являются источником питания микроорганизмов при их культивировании [1–3]. Для нормального обеспечения развития бактериальных клеток необходим азот органических соединений, который они получают благодаря правильно подобранной питательной основе — белковым гидролизатам¹.

Питательная ценность и свойства белковых гидролизатов обусловлены исходным сырьем и способом гидролиза. Для их производства может служить любое полноценное по аминокислотному составу сырье, содержащее природные белки [4–9]. Одним из перспективных направлений в биотехнологии является поиск и активное привлечение новых источников белкового сырья в производство питательных основ и сред. Примером такого сырья могут служить отработанные куриные эмбрионы (ОКЭ), являющиеся отходами производства противогриппозных препаратов. Применение этого сырья для получения ПС вполне обосновано, так как известны высокие ростовые свойства яичных сред, а также наличие биостимуляторов роста микроорганизмов в экстракте куриных эмбрионов [1, 10].

Важным аспектом при производстве гидролизатов является выбор способа их получения.

Ранее нами были проведены исследования по созданию кислотных гидролизатов из ОКЭ [11, 12]. В качестве гидролизующего агента использовались соляная и серная кислоты. Наличие в ПС хлорид-ионов или сульфат-ионов, накапливаемых при использовании кислотных гидролизатов, избирательно для ряда микроорганизмов. Избыточное количество этих ионов бывает нежелательно и может ингибировать биотехнологические процессы [1, 13–16].

Цель исследования — разработка технологии приготовления ферментативного гидролизата ОКЭ (ФГОКЭ) и оценка ростовых свойств плотной ПС на его основе с использованием тест-штаммов *Escherichia coli* M-17 и *Pseudomonas alcaligenes* IP-1.

Материалы и методы

Материалы:

- 12-суточные куриные эмбрионы, после извлечения вирусосодержащей аллантоисной жидкости предоставленные АО НПО «Микроген»;
- поджелудочные железы (ПЖ) крупного рогатого скота ГОСТ 11285–2017²;
- плотная ПС на основе ФГОКЭ лабораторного приготовления, pH 7,2;
- мясо-пептонный бульон (МПБ) производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере

защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, pH 7,2.

Ростовые свойства ПС, приготовленной на основе разрабатываемого гидролизата, исследовали с использованием тест-штаммов *Escherichia coli* M-17 и *Pseudomonas alcaligenes* IP-1 из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Вятский ГАТУ.

Используемое сырье, реактивы и препараты отвечали требованиям действующих ГОСТ, ТУ, ОСТ.

Методы

ФГОКЭ оценивали по физико-химическим показателям³: pH (потенциометрическим методом); содержание аминного азота N_{ам} (методом Зеренсен–Гаврилова); содержание общего азота (методом Кьельдаля); содержание натрия хлорида (аргентометрическим титрованием по методу Мора), степень расщепления белка (СРБ) рассчитывали по соотношению величин аминного и общего азота в процентном эквиваленте.

Выращивание культур осуществляли на экспериментальной ПС и контрольной. Выращивание тест-штамма *E. coli* M-17 проводили на чашках Петри при температуре (37 ± 1) °C в течение двух суток. Выращивание тест-штамма *Ps. alcaligenes* IP-1 осуществляли на чашках Петри при температуре (28 ± 1) °C также в течение двух суток. Рост культур оценивали в динамике, через 24 и 48 ч путем определения количества выросших колоний и их размера. Характер роста культуры и типичность морфологических свойств колоний оценивали визуально.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel. Статистическую значимость средних значений оценивали с применением непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни (программа Statistica 10.0).

Результаты и обсуждение

Подготовка ОКЭ к гидролизу была проведена по ранее предложенному способу [11], которая заключалась в их санитарной обработке, измельчении и автоклавировании, обеспечивающих обеззараживание отходов вакцинного производства.

В лабораторных условиях спланирован и проведен опыт по получению ФГОКЭ. В качестве гидролизующего агента использовали ПЖ крупного рогатого скота. Выбор оптимального соотношения компонентов гидролиза проводили при помощи факторного метода планирования эксперимента. Для этого был спланирован и проведен опыт по методу латинских прямоугольников [17].

Планирование эксперимента позволило получить математическую модель, связывающую выходные параметры (факторы варьирования) с входными. Факторами варьирования были выбраны массовая доля субстрата и массовая доля гидролизу-

¹ Шепелин АП. Разработка технологии производства панкреатического гидролизата рыбной муки и конструирование на его основе бактериологических питательных сред: дис. ... д-ра биол. наук. М.: 2013.

² ГОСТ 11285–2017. Железы поджелудочные крупного рогатого скота и свиней замороженные. Технические условия.

³ Методические указания МУК 4.2.2316–08. Методы контроля бактериологических питательных сред. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.

ющего агента ПЖ. В качестве выходного параметра — значение аминного азота.

Для определения оптимальных значений данных факторов была составлена схема планирования эксперимента. Схема опыта составлена по принципу сочетания каждого уровня любого фактора одинаковым количеством раз со всеми уровнями остальных факторов. Следует отметить, что при планировании и реализации эксперимента температура, pH реакционной смеси и продолжительность гидролиза оставались в заданных границах.

При осуществлении процесса гидролиза с варьированной загрузкой субстрата и гидролизующего агента проводили контроль значения аминного азота. Значение последнего находилось в пределах от 0,081 до 0,256%. Массовая доля субстрата варьировалась от 100 до 500 г/л, а массовая доля гидролизующего агента — от 50 до 125 г/л. На основании указанных данных определяли оптимальную загрузку сырья и гидролизующего агента путем расчета эффектов действующих факторов. По данным расчетов установлено, что оптимальная массовая доля субстрата — 500 г/л, а оптимальная массовая доля гидролизующего агента — 100 г/л. Исходя из полученных данных были приготовлены экспериментальные серии ФГОКЭ.

Ферментативный гидролиз белков животного происхождения предусматривает ведение процесса при pH от 7,0 до 8,0, при этом время гидролиза колеблется от 2 до 7 суток в зависимости от температуры гидролиза [1–3, 6, 15]. В данной работе установлено, что гидролизующий агент ПЖ проявляет свою максимальную активность при pH от 7,3 до 7,9 и температуре от 48 до 50 °С. При данных условиях был проведен ферментативный гидролиз ОКЭ. В течение всего процесса контролировали содержание аминного азота в смеси. Нарастание данного параметра прекратилось на 48 ч

гидролиза, что позволяет нам сделать вывод о завершении расщепления белка в смеси. Таким образом, были определены технологические параметры ферментативного гидролиза ОКЭ. Данные представлены в таблице 1.

По разработанной технологии были приготовлены три серии ФГОКЭ. Полученные образцы экспериментальных серий были темно-желтого цвета, прозрачные, имели характерный яичный запах. Физико-химические характеристики экспериментальных серий представлены в таблице 2. Для сравнения в таблице 2 представлены физико-химические характеристики МПБ.

Из данных, представленных в таблице 2, следует, что приготовленные серии ФГОКЭ по изучаемым показателям сопоставимы между собой. Что касается сравнения ФГОКЭ и МПБ, то по СРБ ферментативный гидролизат ОКЭ превосходит ПС, приготовленную из МПБ. Содержание хлоридов в экспериментальном гидролизате во всех трех сериях практически отсутствует, что необходимо учитывать при конструировании ПС. На основании полученных физико-химических характеристик экспериментальных серий гидролизата для оценки возможности использования ФГОКЭ в качестве основы ПС была выбрана серия 2.

Для изучения ростовых свойств экспериментальной плотной ПС использовали тест-штаммы *E. coli* M-17 и *Ps. alcaligenes* IP-1. В качестве контрольной среды выбрана плотная ПС на основе МПБ. В таблице 3 представлены прописи экспериментальной и контрольной плотных ПС.

Сравнительная оценка роста тест-штаммов *E. coli* M-17 и *Ps. alcaligenes* IP-1 на контрольной и экспериментальной ПС представлена в таблицах 4 и 5.

Культура *E. coli* при росте на всех плотных ПС образовывала типичные круглые с гладкой, выпуклой поверхностью, ровными краями непрозрачные колонии сероватого цвета.

Таблица 1. Технологические параметры ферментативного гидролиза отработанных куриных эмбрионов

Table 1. Technological parameters of enzymatic hydrolysis of waste chick embryos

Параметр Parameter	Значение параметра Value
pH	7,6 ± 3,0
Продолжительность гидролиза, ч Duration of hydrolysis, h	48 ± 2,0
Температура гидролиза, °С Hydrolysis temperature, °C	49 ± 1,0

Таблица 2. Физико-химические показатели экспериментальных серий ферментативного гидролизата отработанных куриных эмбрионов

Table 2. Physico-chemical properties of the experimental batches of the enzymatic hydrolysate of waste chick embryos

Показатель Test parameter	Значение показателя для МПБ ($\bar{X} \pm I_{95\%}$, $n = 3$) Value for MPB ($\bar{X} \pm I_{95\%}$, $n = 3$)	Значение показателя для ФГОКЭ Value for WCEEH		
		серия 1 batch 1	серия 2 batch 2	серия 3 batch 3
Массовая доля аминного азота, % Amine nitrogen content, %	0,10 ± 0,02	0,199	0,195	0,192
Массовая доля общего азота, % Total nitrogen content, %	0,43 ± 0,07	0,355	0,349	0,343
pH	7,20 ± 0,14	7,40	7,10	7,25
Массовая доля натрия хлорида, % Total sodium chloride content, %	0,10 ± 0,03	0,03	0,03	0,03
Массовая доля сухого остатка, % Dry residue, %	3,06 ± 0,56	6,6	6,7	6,7
СРБ, % Degree of protein cleavage, %	25,04 ± 3,16	56	56	56

Примечание. ФГОКЭ — ферментативный гидролизат отработанных куриных эмбрионов; МПБ — мясо-пептонный бульон; СРБ — степень расщепления белка.

Note. WCEEH—waste chick embryo enzymatic hydrolysate; MPB—meat-peptone broth.

Таблица 3. Состав плотных питательных сред
Table 3. Composition of solid nutrient media

Ингредиенты Components	Состав плотной ПС на основе Composition of a solid nutrient medium based on	
	ФГОКЭ (экспериментальная) WCEEH (test)	МПБ (контрольная) MPB (control)
ПО NB	Разведенная дистиллированной водой до величины $N_{ам} = (0,100 \pm 0,05)\%$, из расчета на 1 дм ³ ПС Diluted in distilled water to $N_{ам} = (0,110 \pm 0,05)\%$, calculated for 1 дм ³ of NM	1 дм ³ 1 dm ³
NaCl, г/дм ³ NaCl, g/dm ³	5	—
KCl, г/дм ³ KCl, g/dm ³	0,2	0,2
Na ₂ HPO ₄ , г/дм ³ Na ₂ HPO ₄ , g/dm ³	1	1
Агар, г/дм ³ Agar, g/dm ³	20	20

Примечание. ПС — питательная среда; ФГОКЭ — ферментативный гидролизат отработанных куриных эмбрионов; МПБ — мясо-пептонный бульон; ПО — питательная основа; $N_{ам}$ — массовая доля аминного азота. «—» — данный компонент не вносили в питательную среду.

Note. NM—nutrient medium; WCEEH—waste chick embryo enzymatic hydrolysate; MPB—meat-peptone broth; NB—nutritional base; $N_{ам}$ —mass fraction of amine nitrogen. —the component was not added to the nutrient medium.

Таблица 4. Сравнительная оценка роста тест-штамма *E. coli* M-17 на контрольной и экспериментальной средах
Table 4. Comparative assessment of the *E. coli* M-17 test strain growth on the control and test media

ПС на основе Nutrient medium based on	Продолжительность культивирования, ч Duration of cultivation, h	КОЕ/см ³ ($\bar{X} \pm I_{95}, n = 6$) CFU/cm ³ ($\bar{X} \pm I_{95}, n = 6$)	Размер колоний, мм Colony size, mm
ФГОКЭ (экспериментальная) WCEEH (test)	24	36,0 ± 2,06	2–3
	48	45,0 ± 2,34	3–4
МПБ (контрольная) MPB (control)	24	37,0 ± 1,08	2–3
	48	49,0 ± 2,48	3–4

Примечание. ПС — питательная среда; ФГОКЭ — ферментативный гидролизат отработанных куриных эмбрионов; МПБ — мясо-пептонный бульон; КОЭ — колониеобразующие единицы. Посевная доза составила 50 КОЭ/см³.

Note. NM—nutrient medium; WCEEH—waste chick embryo enzymatic hydrolysate; MPB—meat-peptone broth; CFU—colony-forming unit. The seeding dose was 50 CFU/cm³.

Таблица 5. Сравнительная оценка роста тест-штамма *Ps. alcaligenes* IP-1 на контрольной и экспериментальной средах
Table 5. Comparative assessment of the *Ps. alcaligenes* IP-1 test strain growth on the control and test media

ПС на основе Nutrient medium based on	Продолжительность культивирования, ч Duration of cultivation, h	КОЕ/см ³ ($\bar{X} \pm I_{95}, n = 6$) CFU/cm ³ ($\bar{X} \pm I_{95}, n = 6$)	Размер колоний, мм Colony size, mm
ФГОКЭ (экспериментальная) WCEEH (test)	24	36,00 ± 2,06	2–3
	48	48,00 ± 3,09	3–4
МПБ (контрольная) MPB (control)	24	38,00 ± 2,14	2–3
	48	50,00 ± 2,7	3–4

Примечание. ПС — питательная среда; ФГОКЭ — ферментативный гидролизат отработанных куриных эмбрионов; МПБ — мясо-пептонный бульон; КОЭ — колониеобразующие единицы. Посевная доза составила 50 КОЭ/см³.

Note. NM—nutrient medium; WCEEH—waste chick embryo enzymatic hydrolysate; MPB—meat-peptone broth; CFU—colony-forming unit. The seeding dose was 50 CFU/cm³.

Культура *Ps. alcaligenes* при росте как на экспериментальной, так и на контрольной плотных ПС образовывала типичные желтоватые колонии с тонкими, неровными, «ползущими» краями.

Как следует из данных, представленных в таблицах 4 и 5, при одинаковом количестве выросших на экспериментальной и контрольной ПС колоний их размер на экспериментальной среде незначительно уступает по данному показателю колониям микроорганизмов, выросшим на контрольной ПС. Ростовые

свойства экспериментальной среды сопоставимы с таковыми питательной среды, приготовленной на основе МПБ.

Выводы

1. В результате проведенного исследования обоснованы оптимальные технологические параметры ферментативного гидролиза ОКЭ: pH ($7,6 \pm 0,3$), продолжительность (48 ± 2) ч, температура (49 ± 1) °C.

2. Оптимизирована загрузка компонентов для проведения гидролиза: массовая доля субстрата 500 г/л, массовая доля гидролизующего агента 100 г/л.

3. Полученная белковая основа микробиологических ПС, ФГОКЭ по своим физико-химическим показателям качества пригодна для конструирования микробиологических сред.

4. Плотная ПС на основе экспериментального гидролизата стабильно обеспечивает рост тест-штаммов *E. coli* M-17 и *Ps. alcaligenes* IP-1 с типичными свойствами. Ростовые свойства экспериментальной среды сопоставимы с таковыми питательной среды, приготовленной на основе мясо-пептонного бульона.

5. Дальнейшие исследования целесообразно направить на оптимизацию ПС для конкретного микроорганизма.

Вклад авторов. Ю. С. Овсянников — формирование концепции статьи, написание текста рукописи, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; М. С. Дурсенев — экспериментальная работа по определению показателей качества ферментативных гидролизатов и питательных сред, статистическая обработка результатов исследований, сбор информации, изложенной в научной литературе, работа с табличным материалом, редактирование рукописи.

Authors' contributions. Yuriy S. Ovsyannikov—elaboration of the concept of the paper; writing of the text, approval of the final version of the paper for publication; Maksim S. Dursenev—experimental determination of the quality parameters of enzymatic hydrolysates and nutrient media, statistical processing of the obtained results, compilation of available scientific data, preparation of the tables, editing of the paper.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was not sponsored by any organisation.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this paper.

Литература/References

1. Телишевская ЛЯ. Белковые гидролизаты: получение, состав, применение. М.: Аграр. наука; 2000. [Telishevskaya LYa. Protein hydrolysates: preparation, composition, application. Moscow: Agrar. nauka; 2000 (In Russ.)]
2. Суханова СМ, Захарова НЕ. Питательные среды в практике микробиологических исследований (Гл. 8). В кн.: Лабинская АС, Волина ЕГ, ред. Руководство по медицинской микробиологии. Кн. 1. Общая и санитарная микробиология. М.: Бином; 2008. С. 221–54. [Sukhanova SM, Zakharova NE. Nutrient media in microbiological research practice. In: Labinskaya AS, Volina EG, eds. Guideline on medical microbiology. Bk. 1. General and sanitary microbiology. Moscow: Binom; 2008. P. 221–54 (In Russ.)]
3. Ковтун ЮС, Курилова АА, Таран ТВ, Катунина ЛС, Чурикова НВ. Сравнительная оценка потенциальных белковых основ микробиологических сред. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014;(3):92–5. [Kovtun YuS, Kurilova AA, Taran TV, Katunina LS, Churikova NV. Comparative assessment of prospective protein bases for microbiological media. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2014;(3):92–5 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2014-3-92-95>
4. Калягина СЮ. Создание питательной среды из отходов мясного сырья и оценка ее свойств. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008;(3):91–3. [Kalyagina SYu. Development of growth medium from meat processing waste products and assessment of its properties. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2008;(3):91–3 (In Russ.)]
5. Филимонова ГВ, Тетерин ВВ, Лещенко АА, Лазыкин АГ, Погорельский ИП, Бирюков ВВ и др. Использование гидролизатов крови крупного рогатого скота, как элементов субстратного питания чумного микроба. *Биозащита и биобезопасность*. 2014;4:50–2. [Filimonova GV, Teterin VV, Leshchenko AA, Lazynkin AG, Pogorelsky IP, Biryukov VV, et al. The use of cattle blood hydrolysates as the elements of substrate nutrition of plague microbe. *Biozashchita i bezopasnost = Biosecurity and Biosafety*. 2014;4:50–2 (In Russ.)]
6. Коваленко ЕА, Тетерин ВВ, Мохов ДА, Филимонова ГВ, Пермяков РГ, Овсянников ЮС и др. Изучение возможности переработки вторичного сырья убоя птицы в гидролизаты микробиологических сред. *Хранение и переработка сельхозсырья*. 2015;(7):17–9. [Kovalenko EA, Teterin VV, Mokhov DA, Filimonova GV, Permyakov RG, Ovsyannikov YuS, et al. Exploring the possibility of recycling secondary materials of poultry slaughtering into hydrolysates of microbiological culture medias. *Khraneniye i pererabotka sel'khozsyrya = Storage and Processing of Farm Products*. 2015;7:17–9 (In Russ.)]
7. Никифоров АС, Антонычева МВ, Волох ОА, Еремин СА, Киреев МН, Жулидов ИМ и др. Разработка питательных сред на основе непищевого сырья для глубинного культивирования штаммов холерного вибриона. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015;(1):85–8. [Nikiforov AK, Antonycheva MV, Volokh OA, Eremin SA, Kireev MN, Zhulidov IM, et al. Development of food-raw-material-based nutrient media for submerged cultivation of cholera vibrio strains. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2015;(1):85–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-1-85-88>
8. Гостищева СЕ, Катунина ЛС, Курилова АА, Абзаева НВ, Ковтун ЮС, Жаринова НВ и др. Применение плотной питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного в производстве вакцины чумной живой и для хранения вирулентных штаммов чумного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018;1:75–8. [Gostishcheva SE, Katunina LS, Kurilova AA, Abzaeva NV, Kovtun YuS, Zharinova NV, et al. Usage of solid medium on the basis of corn-steep extract hydrolysate in manufacturing of live plague vaccine and for plague agent preservation. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2018;(1):75–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-1-75-78>
9. Курилова АА, Таран ТВ, Катунина ЛС, Головнева СИ. Разработка питательных сред из растительного сырья для культивирования возбудителей особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009;3(101):66–8. [Kurilova AA, Taran TV, Katunina LS, Golovneva SL. Development of nutrient media out of vegetable material for culturing particularly dangerous infections agents. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2009;3(101):66–8 (In Russ.)] [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-3\(101\)-66-68](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-3(101)-66-68)
10. Велямов МТ, Кенжеева ЖК, Кашаганова ЖА. Использование питательной среды из ферментативного гидролизата некондиционных куриных яиц для культивирования производственных штаммов на предприятиях. *Международный журнал экспериментального образования*. 2015;(3-1):86–9. [Velyamov MT, Kenzheyeva ZhK, Kashaganova ZhA. The use of a nutrient medium from the enzymatic hydrolysate of substandard chicken eggs for

- the cultivation of production strains at enterprises. *Mezhdunarodnyy zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniya = International Journal of Experimental Education*. 2015;(3(1)):86–9 (In Russ.)] <http://expeducation.ru/ru/article/view?id=6707>
11. Овсянников ЮС, Коваленко ЕА, Филимонова ГВ, Лещенко АА, Погорельский ИП, Лазыкин АГ и др. Использование гидролизатов отработанных куриных эмбрионов как основы микробиологических сред. *Хранение и переработка сельхозсырья*. 2015;(11):45–8. [Ovsyannikov YuS, Kovalenko EA, Filimonova GV, Leshchenko AA, Pogorel'sky IP, Lazykin AG, et al. The use of hydrolyzates of waste chicken embryos as the basis for microbiological media. *Khreneniye i pererabotka sel'khozsyrya = Storage and Processing of Farm Products*. 2015;(11):45–8 (In Russ.)]
 12. Овсянников ЮС, Филимонова ГВ, Коваленко ЕА, Лещенко АА, Погорельский ИП, Лазыкин АГ. Перспективы использования отработанных куриных эмбрионов для получения микробиологических питательных сред. *Хранение и переработка сельхозсырья*. 2016;(5):37–41. [Ovsyannikov YuS, Filimonova GV, Kovalenko EA, Leshchenko AA, Pogorel'sky IP, Lazykin AG. Perspectives of using of waste chicken embryos for microbiological nutrient media. *Khreneniye i pererabotka sel'khozsyrya = Storage and Processing of Farm Products*. 2016;(5):37–41 (In Russ.)]
 13. Поляк МС, Сухаревич ВИ, Сухаревич МЭ. *Питательные среды для медицинской микробиологии*. СПб.: НИЦФ; 2003. [Polyak MS, Sukharevich VI, Sukharevich ME. *Nutrient media for medical microbiology*. St. Petersburg: RCPH; 2003 (In Russ.)]
 14. Шепелин АП, Дятлов ИА. *Питательные среды для энтеробактерий*. М.: Династия; 2017. [Shepelin AP, Dyatlov IA. *Nutrient media for enterobacteria*. Moscow: Dinastia; 2017 (In Russ.)]
 15. Ковтун ЮС, Курилова АА, Катунина ЛС, Василенко ЕИ. Сравнительная оценка белковых гидролизатов при разработке на их основе питательной среды для культивирования бруцелл. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(4):93–7. [Kovtun YuS, Kurilova AA, Katunina LS, Vasilenko EI. Comparative evaluation of protein hydrolyzates in the process of constructing based on them nutrient medium for brucella cultivating. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(4):93–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-93-97>
 16. Максимюк НН, Марьяновская ЮВ. О преимуществах ферментативного способа получения белковых гидролизатов. *Фундаментальные исследования*. 2009;(1):34–5. [Maksimyuk NN, Mar'yanovskaya YuV. About the advantages of the enzymatic method for obtaining protein hydrolyzates. *Fundamental'nyye issledovaniya = Fundamental Research*. 2009;(1):34–5 (In Russ.)]
 17. Зедгинидзе ИГ. *Планирование эксперимента для исследования многокомпонентных систем*. М.: Наука; 1976. [Zedginidze IG. *Planning an experiment for the study of multicomponent systems*. Moscow: Nauka; 1976 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Овсянников Юрий Степанович, канд. биол. наук, доцент. *Yuriy S. Ovsyannikov*, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor. **SPIN-код РИНЦ**: 4919-1621

Дурсенев Максим Сергеевич, канд. биол. наук, доцент. *Maksim S. Dursenev*, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor. **ORCID**: <https://orcid.org/0000-0002-8205-5042>

Поступила 01.06.2021

После доработки 02.08.2021

Принята к публикации 03.09.2021

Received 1 June 2021

Revised 2 August 2021

Accepted 3 September 2021

Дмитрий Константинович Львов (к 90-летию со дня рождения)

Dmitry Konstantinovich Lvov (on the 90th Anniversary)



Дмитрию Константиновичу Львову — доктору медицинских наук, профессору, академику РАН — исполнилось 90 лет со дня рождения.

Дмитрий Константинович Львов родился 26 июня 1931 г. в Москве. В 1955 г. с отличием окончил Военно-медицинскую академию им. С. М. Кирова. Служил в Советской Армии (до 1957 г.) младшим научным сотрудником в Институте санитарии МО СССР. После демобилизации (1957–1960 гг.) работал младшим научным сотрудником Института медицинской паразитологии и тропической медицины Минздрава СССР. Далее Д. К. Львов был переведен в Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР, где работал последовательно в должностях младшего, старшего научного сотрудника, заведующего лабораторией.

С октября 1967 г. Дмитрий Константинович работал в Институте вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН на должностях руководителя лаборатории генетики арбовирусов, руководителя отдела экологии вирусов, а затем заместителя директора по науке. С 1987 по 2014 г. являлся директором Института вирусологии имени Д. И. Ивановского РАМН. В настоящее время Дмитрий Константинович — главный научный сотрудник, заведующий отделом экологии вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского, входящего в состав ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России.

В 1960 г. Д. К. Львов защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата наук, а в 1965 г. — на соискание ученой степени доктора медицинских наук. В 1975 г. был избран членом-корреспондентом, а в 1984 г. — академиком АМН СССР по специальности «Вирусология».

Академик Д. К. Львов — всемирно известный ученый, с именем которого связано создание и развитие новых научных направлений в вирусологии — экологии вирусов и популяционной генетики арбовирусов, а также исследований, посвященных изучению механизмов формирования

популяционных генофондов вирусов. Под руководством Д. К. Львова были выделены новые вирусы семейства арбовирусов, а также описаны ранее неизвестные инфекции — Карельская лихорадка, Иссык-Кульская лихорадка, лихорадка Тамды, лихорадка долины Сыр-Дарьи. Д. К. Львов внес огромный вклад в изучение экологии и молекулярной эпидемиологии гриппа. Под его руководством проводятся исследования, направленные на прогнозирование и выявление эпидемических штаммов вируса гриппа на территории Российской Федерации.

Дмитрием Константиновичем создана школа вирусологов, специалистов в области арбовирусологии и экологии вирусов. Д. К. Львов является автором и соавтором более 700 научных трудов, в том числе 11 монографий и руководств по общей и частной вирусологии, уникального атласа (Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории РФ, 2001). Результаты его фундаментальных трудов способствовали развитию современной вирусологии и эпидемиологии, широко применяются в клинической практике, в том числе в борьбе с такими заболеваниями, как грипп и гепатит.

Д. К. Львов — трижды лауреат премии имени Д. И. Ивановского РАМН, лауреат премии имени Н. Ф. Гамалеи РАМН. В 1976 г. награжден орденом «Знак Почета», в 1991 г. — орденом Ленина за создание в стране нового научного направления — экологии вирусов и разработку теоретических направлений по этой проблеме. В 1999 г. Дмитрий Константинович Львов стал лауреатом Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники за проведение в масштабе страны исследований по проблеме новых и вновь возвращающихся инфекций и создание Атласа.

Сердечно поздравляем Дмитрия Константиновича с юбилеем! Желаем крепкого здоровья, профессиональных успехов и благополучия!



Подписку на журнал
«БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение»
можно оформить в любом отделении АО «Почта России»

Подписной индекс издания:

- с любого номера в региональных агентствах подписки
«Урал-Пресс» (www.ural-press.ru) — 57941
- По объединенному каталогу
«Пресса России» (www.pressa-rf.ru) — Т57941



ISSN 2221-996X



9 772221 996004