

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»

---

**РУКОВОДСТВО  
ПО ПРОВЕДЕНИЮ  
КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

**(ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ  
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ)**

*Часть вторая*

Москва  
2012

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

доктор медицинских наук Миронов А.Н. – председатель

профессор Меркулов В.А., профессор Бунятян В.А., профессор Бондарев В.П., профессор Борисевич И.В., профессор Горбунов М.А., профессор Журавлева М.В., профессор Мовсисянц А.А., академик РАМН Медуницын Н.В., профессор Никитюк Н.Ф., к.м.н. Озерцовский Н.А.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

академик РАМН Гинцбург А.Л., академик РАМН Зверев В.В., академик РАН Киселев О.И., академик РАМН Львов Д.К., член-корр. РАМН Савченко В.Г., академик РАМН Сергеев А.Н., академик РАМН Софронов Г.А., академик РАН и РАМН Хаитов Р.М.

Рецензенты:

профессор Шамшева О.В.

профессор Ткаченко Е.А.

профессор, член-корр. РАН Пименов Е.В.

**Р 00 Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты).** Часть вторая. — М.: Гриф и К, 2012. — 212 с.

Рекомендовано Ученым советом ФГБУ «НЦЭСМП»

Минздравсоцразвития России

22 декабря 2011 г., протокол № 6

Настоящий документ не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений .....	5
Предисловие .....	6
Термины и определения .....	8

### Раздел I. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Глава 1. Правовые и этические аспекты клинических исследований .....	19
Глава 2. Документальное оформление клинических исследований ИЛП .....	25
2.1. Протокол клинических исследований .....	25
2.2. Индивидуальная регистрационная карта .....	28
2.3. Информированное согласие .....	29
2.4. Отчет о результатах клинического исследования .....	30
2.5. Брошюра исследователя .....	32
Глава 3. Цели и задачи отдельных этапов клинических исследований .....	34
Глава 4. Оценка безопасности и эффективности ИЛП в клинических исследованиях .....	37
4.1. Безопасность и переносимость .....	37
4.2. Реактогенность .....	39
4.3. Противопоказания к применению .....	44
4.4. Иммуногенность .....	47
4.5. Профилактическая эффективность .....	49
4.6. Эпидемиологическая эффективность .....	52
4.7. Лечебная эффективность .....	53
4.8. Экономическая эффективность .....	58

### Раздел II. ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП ИЛП

Глава 5. Особенности проведения клинических исследований вакцин (общие положения) .....	63
5.1. Виды вакцин и их характеристика .....	63
5.2. Общие положения проведения клинических исследований вакцин .....	65
Глава 6. Особенности проведения клинических исследований вакцин против гриппа .....	83
6.1. Клинические исследования инактивированных гриппозных вакцин .....	83
6.2. Клинические исследования живых гриппозных вакцин .....	89
Глава 7. Особенности проведения клинических исследований вакцин против ВИЧ/СПИД .....	99
7.1. Особенности клинических исследований анти-ВИЧ-вакцин .....	99
7.2. Принципы организации клинических испытаний отечественных кандидатных вакцин против ВИЧ/СПИД. Методы изучения специфического иммунного ответа у привитых добровольцев .....	116
Глава 8. Особенности проведения клинических исследований вакцин против особо опасных инфекций .....	145
Глава 9. Особенности проведения клинических исследований вакцин против кори, паротита и краснухи .....	150
Глава 10. Особенности проведения клинических исследований вакцин против бешенства .....	156
Глава 11. Особенности проведения клинических исследований оспенных вакцин .....	161
Глава 12. Особенности проведения клинических исследований вакцин против пневмококковой инфекции .....	166

Глава 13. Особенности проведения клинических исследований противотуберкулезных вакцин .....	169
Глава 14. Особенности проведения клинических исследований аллергенов .....	184
Глава 15. Особенности проведения клинических исследований бактериофагов .....	187
Глава 16. Особенности проведения клинических исследований пробиотиков .....	192
Глава 17. Особенности проведения клинических исследований иммуномодулирующих препаратов бактериального происхождения .....	196
Глава 18. Особенности проведения клинических исследований иммуноглобулинов .....	202
Глава 19. Особенности проведения клинических исследований препаратов факторов свертывания крови .....	205
Глава 20. Особенности проведения клинических исследований диагностических питательных сред .....	209

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ – антитело  
АГ – антиген  
БИ – брошюра исследователя  
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения  
ИК – информационная карта  
ИЛП – иммунобиологические лекарственные препараты  
ИРК – информационная регистрационная карта  
ИС – информированное согласие  
ИФА – иммунофлюоресцентный анализ  
КИ – клинические испытания  
МЕ – международная единица  
НД – нормативная документация  
НЭК – независимый этический комитет  
НЯ – нежелательные явления  
ООИ – особо опасные инфекции  
ОФС – общая фармакопейная статья  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РНГА – реакция непрямо́й гемагглютинации  
РО – регуляторный орган  
РПИ – расширенная программа иммунизации  
РТГА – реакция торможения гемагглютинации  
СГТА – средний геометрический титр антител  
СК – сероконверсия  
СНЯ – серьезные нежелательные явления  
СП – серопротекция  
СПЭ – серьезные побочные эффекты  
ТА – титр антител  
ФЗ – Федеральный закон  
ФС – фармакопейная статья  
ФСП – фармакопейная статья предприятия  
  
GLP – надлежащая лабораторная практика  
GCP – надлежащая практика клинических исследований  
GMP – надлежащая производственная практика  
Ig – иммуноглобулин

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Система организации и проведения клинических исследований иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) имеет целый ряд особенностей, связанных как с природой этих препаратов (живые, инактивированные, генно-инженерные вакцины, иммуноглобулины, аллергены), так и со сферой их применения в практике здравоохранения.

Учитывая широкое применение ИЛП и особенно профилактических препаратов в практике здравоохранения, особое значение приобретает тщательная и объективная оценка их безопасности и эффективности на различных этапах проведения клинических исследований.

Основными задачами клинических исследований ИЛП являются исследования, направленные на оценку их безопасности, реактогенности (характер и частота местных и общих реакций на введение препарата), а также определение показателей иммунологической (выработка специфических антител), профилактической (защита от соответствующих инфекции) и лечебной эффективности.

Существуют международные требования, регламентирующие проведение клинических исследований любого медицинского препарата, которые сформулированы в так называемом международном этическом и научном стандарте: «Правила проведения качественных клинических испытаний» (GCP). В нашей стране соответствующий документ утвержден Минздравсоцразвития России, в котором отражен порядок организации и проведения клинических испытаний, определены их правовые и этические аспекты.

Следует особо подчеркнуть, что общепринятая основа проведения клинических испытаний во всех странах мира базируется на защите прав и достоинства человека, сформулированные в Хельсинской декларации, подписанной руководителями всех стран мира.

Основополагающими требованиями при проведении клинических исследований являются: добровольное участие, полная информированность участников о целях, задачах и пользе исследования, а также о возможных нежелательных явлениях, связанных с введением препарата, обязательное страхование добровольцев, гарантия оказания им, при необходимости, квалифицированной медицинской помощи в полном объеме, отказ от участия в исследованиях на любом этапе.

Клинические исследования проводятся по специально разработанному протоколу, в котором излагаются цели и задачи исследований, методика их проведения, объем и сроки исследования, клинические базы, на которых будут осуществляться исследования, а также этические и правовые аспекты проведения клинических исследований.

В Федеральном Законе № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» определены правовые основы проведения клинических исследований. Протоколы клинических исследований проходят экспертную оценку в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, а также в Совете по этике при Минздравсоцразвития России, и утверждаются Минздравсоцразвития России.

Накопленный в стране многолетний опыт работы, связанный с организацией и проведением клинических исследований различных ИЛП, свидетельствует о том, что качественно и в полном объеме проведенные клинические испытания являются гарантией эффективности и безопасности их применения в практике здравоохранения.

Практическое использование данного издания, несомненно, внесет важный вклад в совершенствование деятельности научных учреждений и организаций, участвующих в создании новых перспективных лекарственных средств.

*Генеральный директор  
ФГБУ «НЦЭСМП»  
Минздравоохранения России  
д. м. н. А.Н. Миронов*

## ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**АДЬЮВАНТ** – вещество, повышающее иммуногенность антигенов, используемое при изготовлении ряда вакцин.

**АЛЛЕРГЕНЫ** – препараты, применяемые для диагностики и лечения аллергических заболеваний, изготовленные из соответствующих компонентов бактериальных клеток, растений, пыльцы и пищевых продуктов.

**АНАТОКСИНЫ** – препараты, содержащие обезвреженные токсины различных видов микробов, которые при введении в организм обеспечивают выработку антитоксического иммунитета и применяются для активной иммунизации.

**АНТИГЕН** – высокомолекулярное соединение, способное стимулировать деятельность иммунокомпетентных клеток и обеспечивать тем самым развитие иммунного ответа.

**АНТИГЕННОСТЬ ВАКЦИНЫ** – свойство вакцины стимулировать продукцию антител у привитых людей; измеряется определением титра антител.

**АНТИТЕЛА** – глобулины человека (животных), образующиеся в организме в ответ на введение антигена (бактерии, вирусы, токсины).

**АНАФИЛАКСИЯ (АНАФИЛАКТИЧЕСКИЙ ШОК)** – общая аллергическая реакция немедленного типа, возникающая после парентерального введения чужеродного белка в ранее сенсибилизированный организм.

**АУДИТ** – систематическая и независимая проверка, осуществляемая лицами, не задействованными в клиническом испытании, с целью подтверждения соответствия проведения исследований утвержденному протоколу.

**БАКТЕРИЙНЫЕ ПРЕПАРАТЫ** – препараты для профилактики, лечения и диагностики инфекционных болезней, изготавливаемые на основе живых или убитых культур бактерий, клеточных компонентов или продуктов жизнедеятельности бактерий.

**БАКТЕРИОФАГИ** – моно- или поливалентные препараты вирусного происхождения, которые при внедрении в организм вызывают лизис и гибель бактериальных клеток.

**БЕЗОПАСНОСТЬ ИЛП** – один из основных критериев оценки качества ИЛП, связанный с отсутствием отрицательного действия на функции человека и риска причинения вреда здоровью.

**БРОШЮРА ИССЛЕДОВАТЕЛЯ** – сводное изложение результатов доклинического и клинического исследования ИЛП, обосновывающих возможность для проведения клинических исследований препарата.

**БУСТЕР-ЭФФЕКТ** – продукция антител и других факторов иммунного ответа на повторное введение антигена после первой иммунизации.

**ВАКЦИНА** – препарат, получаемый из живых аттенуированных штаммов или убитых культур микроорганизмов, или их антигенов, предназначенный для активной иммунизации людей и животных.

Виды вакцин:

аттенуированные – вакцины, полученные путем ослабления вирулентности микроорганизмов под воздействием физических, химических и биологических факторов;

адсорбированные – вакцины, антигены которых сорбированы на веществах, усиливающих и пролонгирующих антигенное раздражение;

генно-инженерные – препараты, принцип создания которых заключается в том, что в геном живых аттенуированных вирусов, бактерий, дрожжей или клеток эукариотов встраивается ген, кодирующий образование протективного антигена того возбудителя, против которого будет направлена вакцина;

ДНК-вакцины – препараты на основе плазмидных ДНК микроорганизмов, кодирующих протективные антигены возбудителей инфекционных болезней, при введении в организм человека индуцируют Т- и В-клеточный иммунитет;



живые – вакцины, содержащие жизнеспособные аттенуированные штаммы патогенного микроорганизма, ослабленного до степени, исключающей возникновение заболевания, но сохранившие антигенные свойства, обуславливающие формирование специфического иммунитета;

комбинированные (комплексные) – препараты, состоящие из нескольких вакцин различного типа, направленные на профилактику одновременно против нескольких инфекций;

конъюгированные – вакцины, содержащие полисахарид микроорганизмов, химически связанный с белковым носителем;

полисахаридные – вакцины на основе полисахарида поверхностных структур микроорганизмов;

убитые (инактивированные) – вакцины, изготовленные из микроорганизмов, инактивированных воздействием физических или химических факторов и обладающие полным набором необходимых антигенов.

**ВАКЦИНАЦИЯ** – введение иммунобиологического препарата в соответствии с Инструкцией по его применению.

**ВАЛИДАЦИЯ** – действия для подтверждения того, что в соответствии с принципами надлежащей клинической практики, любая процедура, процесс, оборудование (включая программное обеспечение или аппаратуру), материалы, действие или система действительно позволяют достичь ожидаемых результатов.

**ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ** – дополнительная контрольная группа при испытаниях вакцины, обычно при плацебо-контролируемых исследованиях, которая может быть необходима, если эффективность активного препарата сравнения не установлена надлежащим образом или в отношении него ранее были получены противоречивые результаты.

**ВОСПРИИМЧИВОСТЬ** – способность организма отвечать на внедрение возбудителя инфекционным процессом в различных формах его проявления. Степень восприимчивости зависит от индивидуальной реактивности организма и определяется неспецифическими и специфическими факторами защиты.

**ДОЗА** – количество препарата, введенное в организм, способное вызывать иммунный ответ.

**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЛП** – биологические, микробиологические, иммунологические, токсикологические, фармакологические, физические, химические и другие исследования ИЛП, проводимые путем применения научных методов оценок в целях получения доказательств качества безопасности и эффективности исследуемого препарата.

**ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ** – показатель, характеризующий число заболевших конкретным заболеванием за определенный период времени.

**ИНТЕНСИВНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ** – уровень заболеваемости конкретного заболевания, рассчитанного на численность населения (1000, 10 000, 100 000 населения).

**ИММУНИТЕТ** – способ защиты организма от любых веществ, несущих на себе генетически чужеродную информацию, направлен на сохранение гомеостаза организма.

Виды иммунитета:

естественный активный иммунитет – образуется в организме человека после перенесенного инфекционного заболевания;

естественный пассивный иммунитет или «иммунитет новорожденных» – передается от матери ребенку в период беременности или при вскармливании грудным молоком;

искусственный активный иммунитет – развивается в ответ на введение вакцинных препаратов;

искусственный пассивный иммунитет – образуется после введения в организм человека готовых специфических антител (сыворотки или иммуноглобулины).

**ИММУНОГЕННОСТЬ ИЛП** – способность медицинского иммунобиологического препарата индуцировать специфические антитела или маркеры клеточного иммунитета, обеспечивающие защиту от соответствующих микроорганизмов.

**ИММУНОГЛОБУЛИНЫ** – препараты, получаемые из сыворотки крови человека путем фракционирования донорской, плацентарной или абортинной крови человека с извлечением активной иммуноглобулиновой фракции; специфические иммуноглобулины направленного действия: противостолбнячный, противогриппозный, против клещевого энцефалита, противостафилококковый и др.

**ИММУНОДИАГНОСТИКА** – диагностика заболеваний или состояния защитных функций организма с помощью методов, основанных на специфическом взаимодействии антигенов с антителами.

**ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ** – оценка влияния иммунобиологического препарата на функции иммунной системы.

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ (ИЛП)** – лекарственные средства биологического происхождения, предназначенные для специфической профилактики, диагностики и лечения заболеваний человека.

**ИММУНОМОДУЛЯТОР** – вещество, влияющее на уровень иммунного ответа организма.

**ИММУНОПРОФИЛАКТИКА (ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА)** – система мероприятий, осуществляемых в целях предупреждения, ограничения распространения и ликвидации инфекционных заболеваний путем иммунизации населения.

**ИНДИВИДУАЛЬНАЯ РЕГИСТРАЦИОННАЯ КАРТА (ИРК)** – документ, используемый для фиксирования данных о субъекте клинического испытания на протяжении всего курса исследования согласно протокола. Сбор данных следует производить в соответствии с процедурами, которые гарантируют сохранность, фиксирование и извлечение информации, а также позволяют получить простой доступ к ним для проверки, аудита или инспектирования.

**ИНСПЕКТИРОВАНИЕ** – ревизия проведения клинического исследования, включая обеспечение качества, задействованный персонал, любых представителей официальных органов и аудит на местах проведения исследования и/или у спонсора с целью проверки соответствия правилам надлежащей клинической практики.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ИЛП** – нормативный документ, содержащий информацию, необходимую в сфере применения его в практике здравоохранения.

**ИНТЕРФЕРОНЫ** – это низкомолекулярные белки (протеины, гликопротеиды), вырабатываемые в организме человека эукариотическими клетками в ответ на внедрение в них биологического агента. Интерфероны способствуют задержке размножения и развития возбудителей инфекций в зараженном организме. Интерфероны относятся к внеклеточным факторам неспецифической резистентности и обладают противовирусным, противобактериальным, противоопухолевым и иммуномоделирующим эффектом.

**ИНФИЛЬТРАТ** – возможная местная реакция на введение препарата, характеризующаяся скоплением не свойственных клеточных элементов, увеличенным объемом и повышенной плотностью.

**ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ** – документально оформленное добровольное согласие испытуемого на участие в клиническом испытании после ознакомления со всеми его особенностями. Просить пациента о данном согласии можно только после предоставления ему надлежащей информации об исследовании, включая разъяснения статуса исследования, его задач, потенциальной выгоды, рисков и неудобств, возможных доступных альтернативных способов лечения, прав и обязанностей пациента в соответствии с нормативными документами.

**ИСПЫТУЕМЫЙ** – участник клинического испытания, которому назначается исследуемый препарат или препарат сравнения.

**ИССЛЕДОВАТЕЛЬ** – лицо, ответственное за проведение клинического исследования, а также за права, здоровье и благосостояние испытуемого. Исследователь должен обладать надлежащей квалификацией и компетенцией в соответствии с местными законами и правилами, что должно подтверждаться резюме и соответствующими дипломами. За решения, касающиеся медицинской помощи и их обеспечения, всегда должно отвечать клинически компетентное лицо, которое может законно осуществлять медицинскую практику.

**ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР** – аккредитованное лечебно-профилактическое учреждение, ответственное за проведение клинического исследования.

**ИССЛЕДУЕМЫЙ ПРЕПАРАТ** – вновь разработанный препарат, прошедший доклинические испытания и разрешенный органами исполнительной власти для проведения клинических испытаний, а также зарегистрированный препарат, проведение клинических испытаний которого необходимо для внесения изменений в Инструкцию по его применению.

**КАЧЕСТВО ИЛП** – соответствие препарата нормативной документации.

**КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЛП** – изучение безопасности и эффективности исследуемого препарата на людях.

**КОГОРТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ** – ретроспективное или проспективное исследование, в котором развитие заболевания, инфекции или иной соответствующей реакции, в течение некоторого времени наблюдается в определенной группе людей.

**КОД ИССЛЕДУЕМОГО (ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ КОД)** – уникальный идентификатор, присваиваемый исследователем каждому испытуемому для обеспечения его анонимности и используемый вместо фамилии в отчетах по исследованию.

**КОНТРОЛЬНАЯ ГРУППА ИССЛЕДУЕМЫХ (ГРУППА СРАВНЕНИЯ)** – лица, получающие препарат сравнения или плацебо, предусмотренные Протоколом клинических исследований.

**КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ИЛП** – лабораторный контроль на соответствие препарата требованиям нормативной документации.

**КОНФИДЕНЦИАЛЬНОСТЬ** – сохранение в тайне информации, принадлежащей спонсору, или информации, позволяющей установить личность испытуемого от неуполномоченных лиц.

**МЕЖДУНАРОДНОЕ МНОГОЦЕНТРОВОЕ КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЛП** – клиническое исследование, проводимое в различных странах по единому протоколу клинического исследования.

**МЕСТНЫЕ ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ** – реакции, возникающие в месте введения иммунобиологических препаратов (гиперемия, припухлость, инфильтрат, региональный лимфаденит).

**МИНИМАЛЬНЫЙ РИСК** – уровень риска, с которым сталкивается исследователь во время индивидуальной повседневной деятельности.

**МНОГОЦЕНТРОВОЕ КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПЫТАНИЕ** – клиническое испытание, проводимое по единому протоколу в нескольких исследовательских центрах.

**МОНИТОРИНГ** – процедура контроля за ходом клинического испытания и обеспечения его проведения, сбора данных и представления результатов исследования согласно протоколу, стандартным процедурам.

**МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА** – структурно и функционально гомогенные иммуноглобулины, синтезируемые одним клоном плазмочитов.

**НАДЗОР** – систематический сбор, сравнение и анализ данных, а также доведение необходимой информации до заинтересованных лиц с целью принятия необходимых мер.

**НАДЛЕЖАЩАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ ПРАКТИКА (GCP – Good Clinical Practice)** – стандарт для клинических исследований, в соответствии с которым производятся планирование, управление, проведение, мониторинг, аудит, регистрация, анализ и составление отчетов клинических исследований, обеспечивающий их научную достоверность

и этичность, а также надлежащее документирование клинических данных исследуемого фармацевтического продукта (диагностического, терапевтического или профилактического).

**НАДЛЕЖАЩАЯ ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ ПРАКТИКА** – часть процесса обеспечения качества в фармацевтической сфере, которая удостоверяет, что производимая продукция стабильно соответствует стандартам качества, применимым к их прямому назначению в соответствии с регистрационным удостоверением. В данном руководстве термин «надлежащая производственная практика» относится к действующим руководствам ВОЗ по надлежащей производственной практике.

**НЕЗАВИСИМЫЙ ЭТИЧЕСКИЙ КОМИТЕТ (НЭК)** – независимый орган (экспертный совет или комитет, действующий на уровне организации, региональном, национальном или международном уровне), состоящий из медицинских работников, а также лиц, не имеющих отношения к медицине, который обеспечивает защиту прав, безопасности и благополучия субъектов исследования и выступает для общества гарантом такой защиты, в частности путем рассмотрения, утверждения/одобрения протокола исследования, кандидатур исследователей, исследовательских центров, а также материалов и методов, которые предполагается использовать для получения и документирования информированного согласия субъектов исследования.

Правовой статус, состав, функции, деятельность независимых этических комитетов, а также относящиеся к ним нормативные требования могут различаться в разных странах, тем не менее, НЭК должны функционировать в соответствии с GCP.

**НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫЕ ЯВЛЕНИЯ (НЯ)** – любые неблагоприятные изменения в состоянии здоровья добровольца клинического исследования (включая патологические изменения лабораторных показателей), жалобы или заболевания, которые связаны с применением ИЛП, независимо от наличия причинной связи с его применением, т.е. механизмом его действия.

**НЕПРЕДВИДЕННЫЙ ПОБОЧНЫЙ ЭФФЕКТ ИЛП** – побочный эффект, характер или тяжесть которого не согласуются с имеющейся информацией о препарате (например, с Брошюрой исследователя в случае незарегистрированного препарата или с листком-вкладышем/инструкцией по применению в случае зарегистрированного лекарственного средства).

**НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ** – комплект документов, устанавливающих требования к готовому препарату, его изготовлению, контролю, условиям хранения, транспортирования и применения.

**ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ** – комплекс планомерных и систематических мероприятий, направленных на соблюдение Правил проведения качественных клинических испытаний и действующих нормативных требований в процессе клинического испытания, сбора данных, документального оформления, представления результатов исследования и т.п.

**ОБРАЩЕНИЕ ИЛП** – разработка, доклинические исследования, клинические исследования, экспертиза, государственная регистрация, стандартизация и контроль качества, производство, изготовление, хранение, перевозка, ввоз на территорию Российской Федерации, вывоз с территории Российской Федерации, реклама, отпуск, реализация, передача, применение, уничтожение ИЛП.

**ОБЩАЯ ПОСТАВКАЦИОНАЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ** – реакция на введение препарата, характеризующаяся нарушением общего состояния организма (повышение температуры тела, головная боль, тошнота, рвота и т.д.).

**ОСНОВНАЯ ГРУППА ИССЛЕДУЕМЫХ (ДОБРОВОЛЬЦЕВ)** – лица, получающие исследуемый препарат в соответствии с Протоколом клинических исследований.

**ОСНОВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ** – документы, которые в совокупности или по отдельности позволяют оценить ход клинического исследования и качество полученных данных.

**ОТНОШЕНИЕ ОЖИДАЕМОЙ ПОЛЬЗЫ К ВОЗМОЖНОМУ РИСКУ** – оценка ИЛП, основанная на показателях эффективности и безопасности препарата с учетом нежелательных реакций.

**ОТЧЕТ О КЛИНИЧЕСКОМ ИСПЫТАНИИ/ИССЛЕДОВАНИИ** – представленные в письменной форме результаты испытания/исследования лечебного, профилактического или диагностического средства.

**ПАПУЛА** – морфологический элемент кожной сыпи, представляющий собой безболезненное образование, возвышающееся над уровнем кожи.

**ПЕРВИЧНЫЕ ДАННЫЕ** – необходимая информация для оценки хода выполнения клинического испытания, содержащаяся в исходных записях или их заверенных копиях, отражающих результаты клинического обследования, наблюдения и других действий в рамках исследования. Подлинники или их заверенные копии содержатся в первичной документации.

**ПЛАНОВАЯ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА НАСЕЛЕНИЯ** – основана на соблюдении сроков введения препаратов, регламентированных Национальным календарем профилактических прививок.

**ПЛАЦЕБО** – индифферентное вещество, используемое в качестве контроля при испытании препаратов, внешне не отличающееся от испытуемого препарата.

**ПЛАЦЕБО-КОНТРОЛИРУЕМЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ** – проведение клинических испытаний вакцины с применением препарата сравнения, который не содержит изучаемый антиген. При изучении моновалентных вакцин это может быть нейтральное плацебо (например, физиологический раствор или растворитель, используемый при приготовлении вакцины) или антигенно-отличающаяся вакцина.

**ПОБОЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ** – реакция организма, возникшая в связи с применением ИЛП в дозах, рекомендуемых в инструкции по его применению, для профилактики, диагностики, лечения, не связанная со специфическим действием препарата.

**ПОБОЧНЫЙ ЭФФЕКТ ИЛП** – эффект, отличный от желаемого (не обязательно вредный), появившийся в результате применения профилактической, диагностической или терапевтической процедуры или схемы лечения.

**ПОСТРЕГИСТРАЦИОННОЕ КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЛП** – клиническое исследование ИЛП, осуществляемое после государственной регистрации, в целях дополнительного сбора данных о его безопасности и эффективности, расширения показаний к применению данного препарата, а также выявления нежелательных реакций пациентов на его действие.

**ПОСТМАРКЕТИНГОВЫЙ НАДЗОР** – система мониторинга нежелательных реакций в период после выдачи регистрационного удостоверения. Постмаркетинговый надзор может быть пассивным и активным и включать следующие пункты:

выявление случаев редких нежелательных реакций, не обнаруженных во время проведения исследований до выдачи регистрационного удостоверения;

выявление факторов риска или уже существующих условий, которые могут способствовать возникновению нежелательных реакций.

**ПРАВИЛА ПРОВЕДЕНИЯ КАЧЕСТВЕННЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ/ИССЛЕДОВАНИЙ** – стандарт планирования и проведения испытаний, выполнения мониторинга, аудита и документального оформления клинических испытаний, а также обработки и представления их результатов, служит для общества гарантией достоверности полученных данных и защищенности прав, здоровья и анонимности испытуемых.

**ПРЕПАРАТ СРАВНЕНИЯ** – коммерческий препарат с установленными значениями содержания компонентов, используемый для сравнения в клиническом испытании и предназначенный для проверки достоверности и правильности контроля.

**ПРОБИОТИКИ (ЭУБИОТИКИ)** – это препараты, которые готовятся из представителей нормальной микрофлоры кишечника, антагонистически активной в отношении

патогенных и условно-патогенных кишечных бактерий. Заселяя кишечник, пробиотики способствуют ликвидации дисбактериоза, восстановлению численности нормальной микрофлоры.

**ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ ОТЧЕТ О КЛИНИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ ИЛП** – отчет о промежуточных результатах клинического испытания со статистической обработкой данных.

**ПРОТОКОЛ** – документ, который описывает цели и задачи, методологию, процедуры, статистические методы обработки результатов исследования, организацию исследования и меры по обеспечению безопасности физических лиц, участвующих в клиническом исследовании ИЛП.

**ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ** – количественная мера специфической способности или возможности ИЛП достичь определенного эффекта в соответствии с данными научных исследований.

**РАЗРАБОТЧИК ИЛП** – организация, обладающая правами на результаты доклинических исследований ИЛП, клинических исследований препарата, а также на технологию производства ИЛП.

**РЕАКТОГЕННОСТЬ ПРЕПАРАТА** – свойство препарата вызывать местные или общие реакции организма.

**РЕВАКЦИНАЦИЯ** – введение иммунобиологического препарата после законченного курса вакцинации в соответствии со сроками Календаря профилактических прививок с целью подстегивания иммунного ответа («бустер-эффект»).

**РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА** – невосприимчивость, связанная с неспецифическими факторами защиты организма от инфекционного агента. Различают резистентность видовую и индивидуальную. Видовая резистентность определяется наследственной невосприимчивостью человека к ряду зоонозных инфекций. Индивидуальная резистентность связана с генотипическими и фенотипическими особенностями индивидуумов.

**РАНДОМИЗАЦИЯ** – процесс распределения испытуемых по опытным и контрольным группам случайным образом, позволяющий лицам, включенным в испытания одинаковую возможность получить исследуемый или контрольный препарат. Процесс рандомизации гарантирует достоверность статистического анализа эффекта от применения ИЛП и позволяет определить или исключить незначительные или умеренные различия.

**СЕРИЯ ПРЕПАРАТА** – совокупность образцов препарата, полученных в результате одного технологического процесса.

**СЕРОКОНВЕРСИЯ** – показатель, характеризующий нарастание значения титров специфических антител после вакцинации по сравнению с результатами до вакцинации. Заранее определенное увеличение концентрации антител, коррелирующее с переходом от серонегативного к серопозитивному, обеспечивающее информацию об иммуногенности вакцины. Если антитела являются предшествующими, сероконверсия определяется переходом от предопределенного низкого уровня к значительно более высокому определяемому уровню, например, четырехкратное увеличение в геометрической прогрессии концентрации специфических антител.

**СЕРОПРОТЕКЦИЯ** – показатель, характеризующий уровень специфических антител после вакцинации, обеспечивающих защиту от соответствующего возбудителя.

**СКРИНИНГ** – исследование сывороток крови у лиц, включенных в испытания до введения препарата с целью отбора добровольцев, не имеющих специфических антител.

**СЕРЬЕЗНЫЕ НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫЕ ЯВЛЕНИЯ (СНЯ) И/ЛИ СЕРЬЕЗНЫЕ ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИЛП** – любые неблагоприятные клинические проявления, которые вне зависимости от дозы препарата:

- приводят к смерти;
- представляют угрозу для жизни;
- требуют госпитализации или ее продления;

приводят к стойкой или выраженной нетрудоспособности/инвалидности; являются врожденной аномалией/пороком развития.

**СЛЕПОЙ МЕТОД КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ** – метод, при котором одной и более участвующим в клиническом испытании сторонам, неизвестно, какой из исследуемых препаратов назначен испытуемому. Простой слепой метод – неосведомленность испытуемых о назначенном им лечении. Двойной слепой метод – неосведомленность испытуемых, исследователей, мониторов и, в некоторых случаях, лиц, выполняющих статистическую обработку данных.

**СОБЛЮДЕНИЕ ТРЕБОВАНИЙ (ПРИМЕНИТЕЛЬНО К КЛИНИЧЕСКИМ ИСПЫТАНИЯМ)** – выполнение всех связанных с клиническим испытанием требований Правил качественных клинических испытаний (GCP) и разрешительных инстанций.

**СПОНСОР** – физическое или юридическое лицо, являющееся инициатором клинического исследования или несущее ответственность за его организацию и/или финансирование.

**СРЕДНИЙ ГЕОМЕТРИЧЕСКИЙ ТИТРОВ АНТИТЕЛ (СГТА)** – показатель, характеризующий среднее значение титров специфических антител, полученных при обследовании лиц, участвующих в испытании препарата.

**СТАНДАРТНОЕ ОТКЛОНЕНИЕ** – мера разброса или вариабельности (изменчивости) данных.

**СУБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ** – физическое лицо, участвующее в клиническом исследовании в составе группы, получающей исследуемый препарат, либо в составе контрольной группы.

**СЫВОРОТКИ** – препараты, полученные путем специальной обработки крови искусственно иммунизированных животных, а также крови людей, перенесших соответствующее заболевание или иммунизированных соответствующим вакцинным препаратом.

**ТИТР АНТИТЕЛ** – максимальное разведение сыворотки крови, обеспечивающее выявление специфических антител в соответствующих реакциях.

**ФАЗЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИЛП** – отдельные этапы клинических испытаний ИЛП с определенными целями, задачами и дизайном исследования.

**ЭКСПЕРТНЫЙ СОВЕТ МЕДИЦИНСКОГО УЧРЕЖДЕНИЯ** – независимый орган, включающий в себя специалистов медицинского профиля, научных сотрудников, а также представителей других специальностей. Отвечает за обеспечение прав, безопасности и охраны здоровья испытуемых. Рассматривает, утверждает или пересматривает протокол исследования и поправки к нему, а также документальное оформление информированного согласия испытуемых.

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ПО ДАННЫМ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО СКРИНИНГА** – надзор за инфекционными заболеваниями путем определения соответствующих специфических антител среди различных групп населения.

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИЛП** – характеристика степени положительного влияния ИЛП на течение, продолжительность заболевания или его предотвращение при конкретной инфекции. Различают следующие виды эффективности:

иммунологическая эффективность – сравнительная оценка результатов титров специфических антител в сыворотках крови, взятых до и после вакцинации как в основной, так и в контрольной группах;

лечебная эффективность – способность исследуемого препарата влиять на тяжесть, течение, сроки и исход заболевания среди лиц сравниваемых групп (основная и контрольная);

профилактическая эффективность – потенциальные защитные свойства вакцины, которые оцениваются в контролируемых клинических исследованиях путем сравнения показателей заболеваемости в группе привитых и получивших плацебо;

эпидемиологическая эффективность – оценка эффективности иммунизации при применении вакцины в практике.





## **РАЗДЕЛ I**

# **ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**



## ГЛАВА 1

### ПРАВОВЫЕ И ЭТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

*СОСТАВИТЕЛИ: д. м. н., проф. М.А. Горбунов, д. м. н., проф. Н.Ф. Никитюк, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, Центр экспертизы и контроля ИЛП*

#### Введение

Клинические исследования ИЛП должны проводиться в соответствии с требованиями Национального стандарта РФ, основанного на принципах Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (ВМА), что отражается в ГСР и других нормативных документах.

В Руководстве использованы ссылки на следующие основные нормативные документы:

1. Национальный стандарт Российской Федерации (ГОСТ Р 52379-2005) «Надлежащая клиническая практика».
2. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (в ред. ФЗ от 27.07.2010 № 192-ФЗ, от 11.10.2010 № 271-ФЗ, от 29.11.2010 № 313-ФЗ).
3. Санитарные правила СП 3.3.2.561-96 «Государственные испытания и регистрация новых иммунобиологических лекарственных препаратов» (утв. Постановлением Госкомсанэпиднадзора РФ от 31 октября – 1996 г. № 33).
4. Приказ МЗ РФ № 266 от 19 июня 2003 г. «Об утверждении правил клинической практики в Российской Федерации».
5. Стандарт отрасли ОСТ 42-51199 «Правила проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации» (утв. МЗ России от 29 декабря 1998 г.).
6. Национальный стандарт – ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика».
7. Приказ МЗСР РФ № 750 н от 26 августа 2010 г. «Об утверждении правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» и формы заключения комиссии экспертов.
8. Федеральный закон Российской Федерации № 157-ФЗ от 17.09.98 г. «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней».
9. Приказ Минздравсоцразвития № 51н от 31.01.2011 г. «Об утверждении Национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям».

Основные правовые принципы организации и проведения клинических исследований сводятся к следующему:

- клиническому исследованию предшествует тщательная оценка прогнозируемых рисков в сравнении с ожидаемой пользой; при превышении рисков над ожидаемой пользой любое исследование прекращается;
- клиническое исследование проводится в том случае, когда важность цели исследования превышает связанные с ним риски; это особенно важно, когда субъектами исследования выступают здоровые добровольцы;
- клиническое исследование оправдано в случае, если имеется достоверная вероятность получения пользы от результатов исследования;

- права, безопасность и благополучие субъекта исследования должны превалировать над интересами науки и общества;
- имеющаяся информация об исследуемом препарате должна быть достаточной для обоснования предполагаемого клинического исследования;
- клинические исследования должны соответствовать протоколу, рассмотренному и одобренному Комитетом по этике; содержание протокола должно быть четким и подробным;
- к проведению клинических исследований должны привлекаться лица, имеющие соответствующее образование, подготовку и опыт для выполнения цели и задач конкретного исследования;
- соблюдение прав субъекта исследования на охрану его здоровья, принятие всех мер для минимизации возможного негативного влияния исследования на его физическое и психическое здоровье;
- каждый потенциальный участник должен получить достаточную информацию о целях, методах исследования, принадлежности исследователя к организациям, ожидаемой пользе и потенциальных рисках, которые могут возникнуть в ходе исследования;
- участник исследования должен знать о своем праве отказаться от участия в исследовании и праве отозвать свое согласие на участие в любой момент без каких-либо для себя последствий;
- от каждого участника до включения его в исследование должно быть получено добровольное информированное согласие предпочтительно в письменной форме. Если согласие участника не может быть получено в письменной форме, его устное согласие должно быть официально оформлено и засвидетельствовано;
- обеспечение и защита конфиденциальности информации о субъекте в соответствии с нормативными документами;
- информация, полученная в результате клинического исследования, регистрируется, передается и хранится, обеспечивая точность и правильность ее представления, интерпретации и верификации;
- производство и хранение иммунобиологических препаратов, обращение с ними должно осуществляться в соответствии с правилами качественной производственной практики;
- для обеспечения качества каждого аспекта исследования внедряются системы и операционные процедуры.

Клинические исследования подчиняются этическим нормам, в основе которых лежат уважение к человеку и защита его здоровья и прав. Исследователи, участвующие в исследовательских проектах, должны знать этические, правовые и административные требования к проведению исследований, действующие как на территории своей страны, так и за рубежом. Никакие национальные, этические, правовые или административные требования не должны снижать или исключать защиту прав участников исследования.

Защищать права, безопасность и благополучие всех участников исследования должен независимый этический комитет (НЭК). Это независимый орган (экспертный совет или комитет, действующий на уровне организации, региональном, национальном или международном уровне), состоящий как из медицинских работников, так и лиц, не имеющих отношения к медицине. Комитет по этике должен быть независим от исследователя, спонсора и любого иного влияния.

При обращении в комитет по этике заявитель представляет следующие документы и данные:

- заявление о проведении этической экспертизы со списком прилагаемых документов;
- протокол исследования и его краткое изложение;
- брошюру исследователя;
- форму информированного согласия;

- биографические сведения о главных исследователях по исследовательским центрам;
- материалы информационного и рекламного характера, планируемые для использования в целях привлечения субъектов исследования;
- условия страхования ответственности спонсора или письменное гарантийное обязательство спонсора по компенсации в результате причинения вреда здоровью субъектам исследования;
- условия выплат и компенсаций субъектам исследования.

Документы, поступившие в комитет по этике, подлежат рассмотрению в течение 45 дней со дня поступления. Решение об одобрении клинического исследования принимается на закрытом заседании и выдается заявителю в письменном виде. Комитет по этике должен хранить документацию не менее 3-х лет после завершения исследования и предоставлять ее по требованию разрешительных инстанций.

Комитет по этике должен осуществлять мониторинг текущих исследований. Врач-исследователь обязан предоставить Комитету информацию, необходимую для мониторинга, в особенности информацию о серьезных нежелательных явлениях (СНЯ). Никакие изменения не могут быть внесены в Протокол клинического исследования без рассмотрения и одобрения комитета по этике.

Комитет по этике должен оценивать соответствие научной квалификации исследователя предлагаемому исследованию, а также порядок и размер выплат участникам исследования, чтобы убедиться в отсутствии необоснованной заинтересованности или принуждении участников исследования.

Одна из главных функций комитета по этике состоит в том, чтобы удостовериться, что доброволец в полном объеме и в доступной форме проинформирован о возможном риске и пользе при проведении исследования. Комитет по этике может потребовать, чтобы пациентам была предоставлена дополнительная информация, позволяющая повысить уровень защиты их прав, безопасности, благополучия.

Экспертиза ИЛП осуществляется в соответствии с ФЗ-61 «Об обращении лекарственных средств», приказа № 750 н «Об утверждении правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» и проводится комиссией экспертов экспертного учреждения на основании заданий Министерства здравоохранения и социального развития РФ на проведение экспертизы.

Экспертиза ИЛП проводится по следующим направлениям:

- экспертиза документов для получения разрешения на проведение клинического исследования ИЛП;
- экспертиза качества ИЛП и экспертиза отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения ИЛП, осуществляемые после проведения его клинического исследования.

Экспертиза ИЛП осуществляется комиссией экспертов экспертного учреждения из 3 и более экспертов, назначенной его руководителем. Руководитель экспертного учреждения обеспечивает надлежащее проведение экспертизы ИЛП в соответствии с выданным заданием.

Перед началом проведения экспертизы комиссией экспертов проводится ее организационное заседание, на котором эксперты:

- избирают из своего состава председателя комиссии экспертов и ее ответственного секретаря;
- определяют порядок работы и принятия решений комиссией экспертов;
- определяют основные направления работы экспертов и экспертных групп (при их создании);
- утверждают календарный план работы комиссии экспертов, исходя из срока проведения экспертизы;
- определяют иные положения и условия, необходимые для работы комиссии экспертов и проведения экспертизы.

Организационное заседание экспертной комиссии оформляется протоколом, подписываемым всеми ее членами.

Председатель и ответственный секретарь комиссии экспертов контролируют выполнение экспертами плана работы комиссии экспертов и, при необходимости, совместно принимают решения о его изменении, исходя из срока проведения экспертизы, обобщают мнения и выводы экспертов и обеспечивают подготовку заключения экспертизы.

Эксперт при проведении порученной ему руководителем экспертного учреждения экспертизы лекарственного средства обязан:

- провести полное исследование представленных ему объектов, материалов, дать обоснованное и объективное заключение;
- самостоятельно оценивать результаты исследований, полученные им лично и другими экспертами, ответственно и точно формулировать выводы в пределах своей компетенции;
- не разглашать сведения, которые стали ему известны в связи с проведением экспертизы лекарственного средства, а также сведения, составляющие государственную, коммерческую или иную охраняемую законом тайну;
- соблюдать установленные сроки и порядок проведения экспертизы;
- обеспечить сохранность представленных объектов исследований и материалов.

Эксперт не вправе:

- проводить экспертизу лекарственного средства по обращению непосредственно к нему организаций или физических лиц;
- самостоятельно собирать материалы для проведения экспертизы лекарственного средства;
- проводить экспертизу лекарственного средства в качестве негосударственного эксперта.

Результаты экспертизы лекарственного средства оформляются заключением комиссии экспертов, которое подписывается председателем, ответственным секретарем и остальными членами комиссии.

Ускоренная процедура экспертизы лекарственных средств не применяется в отношении иммунобиологических лекарственных препаратов, впервые регистрируемых в Российской Федерации.

## **1. Порядок проведения экспертизы документов для получения разрешения на проведение клинического исследования ИЛП**

Проведение клинического исследования ИЛП возможно после получения разрешения, которое выдается Федеральным органом исполнительной власти. Для его получения представляются следующие документы:

- заявление на получение разрешения со списком прилагаемых документов;
- проект протокола клинического исследования и краткое его изложение;
- брошюра исследователя;
- форма информированного согласия;
- биографические сведения о главных исследователях по исследовательским центрам;
- материалы информационного и рекламного характера, планируемые для использования в целях привлечения субъектов исследования;
- условия страхования ответственности спонсора или письменное гарантийное обязательство спонсора по компенсации в результате причинения вреда здоровью субъектам исследования;
- условия выплат и компенсаций субъектам исследования;
- перечень исследовательских центров, находящихся на территории РФ;

- заключение комитета по этике о возможности проведения исследований;
- отчет о результатах доклинического исследования.

Экспертиза документов для получения разрешения на проведение клинического исследования ИЛП осуществляется в «НЦЭСМП» комиссией экспертов, которые формируют заключение о возможности или невозможности проведения клинического исследования и направляют его в Министерство здравоохранения и социального развития России. Срок экспертизы составляет 30 рабочих дней со дня получения материалов в «НЦЭСМП». Заключение комиссии экспертов по экспертизе документов для получения разрешения на проведение клинического исследования оформляется по форме, утвержденной приказом МЗ СР РФ № 750 н от 26.08.2010 г.

## **2. Порядок проведения экспертизы качества ИЛП и экспертиза отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения ИЛП** (проводится после завершения всех этапов клинических испытаний)

Данный вид экспертизы проводится в «НЦЭСМП» комиссией экспертов по результатам анализа следующих документов:

- отчета о проведенном клиническом исследовании или отчета о результатах международного многоцентрового клинического исследования;
- проектов макетов упаковки ИЛП;
- проекта нормативной документации на ИЛП либо указания соответствующей фармакопейной статьи;
- информации об условиях хранения, перевозки ИЛП;
- документа (копия), подтверждающего регистрацию ИЛП в случае его регистрации вне территории РФ;
- проекта инструкции по применению ИЛП, который содержит следующие сведения:
  - а) наименование лекарственного средства (международное непатентованное или химическое и торговое наименования);
  - б) лекарственная форма с указанием наименований и количественного содержания (активности) фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ;
  - в) фармакотерапевтическая группа лекарственного препарата;
  - г) показания для применения;
  - д) противопоказания для применения;
  - е) режим дозирования, способ введения, при необходимости время приема лекарственного препарата, продолжительность лечения;
  - ж) меры предосторожности при применении;
  - з) симптомы передозировки, меры по оказанию помощи при передозировке;
  - и) указание, при необходимости, особенностей действия лекарственного препарата при первом приеме или при его отмене;
  - к) описание, при необходимости, действий врача (фельдшера), пациента при пропуске приема одной или нескольких доз лекарственного препарата;
  - л) возможные побочные действия при применении лекарственного препарата;
  - м) взаимодействие с другими лекарственными препаратами и (или) пищевыми продуктами;
  - н) указание возможности и особенностей медицинского применения лекарственного препарата беременными женщинами, женщинами в период грудного вскармливания, детьми, взрослыми, имеющими хронические заболевания;
  - о) сведения о возможном влиянии лекарственного препарата для медицинского применения на способность управлять транспортными средствами, механизмами;
  - п) срок годности и указание на запрет применения лекарственного препарата по истечении срока годности;

- р) условия хранения;
- с) указание на необходимость хранения лекарственного препарата в местах, недоступных для детей;
- т) указание, при необходимости, специальных мер предосторожности при уничтожении неиспользованных лекарственных препаратов;
- у) наименование, адрес производителя лекарственного препарата и адрес места производства лекарственного препарата.

Для проведения экспертизы качества ИЛП заявитель в течение 15 рабочих дней со дня получения решения МЗ СР РФ о возобновлении госрегистрации представляет в экспертное учреждение образцы серий ИЛП в количестве, необходимом для контроля качества. При получении образцов экспертное учреждение выдает заявителю документ, подтверждающий получение образцов, и в срок до 3 рабочих дней уведомляет в письменной форме МЗ СР РФ. Заключение комиссии экспертов по данной экспертизе оформляется по форме, утвержденной приказом МЗ СР РФ № 750 н от 26.08.2010 г.

Экспертиза качества ИЛП и экспертиза отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения ИЛП с оформленными заключениями комиссии экспертов и направление его в Министерство осуществляются в срок, не превышающий 110 рабочих дней со дня получения «НЦЭСМП» соответствующего задания.



## ГЛАВА 2

### ДОКУМЕНТАЛЬНОЕ ОФОРМЛЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИЛП

*СОСТАВИТЕЛИ: д. м. н., проф. М.А. Горбунов, д. м. н., проф. Н.Ф. Никитюк, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравоохранения России, Центр экспертизы и контроля ИЛП*

#### Введение

Организация и проведение клинических исследований ИЛП сопровождаются оформлением ряда документов, которые позволяют качественно провести исследования и получить объективные результаты.

В перечень основных документов клинического исследования входит:

- протокол клинического исследования;
- индивидуальная регистрационная карта;
- информированное согласие субъектов исследования;
- отчет о результатах клинических исследований;
- брошюра исследователя.

#### 2.1. ПРОТОКОЛ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Протокол клинических исследований – документ, содержащий цель и задачи исследования, его методологию, статистические аспекты, организацию и проведение клинических исследований.

Протокол клинических исследований оформляется по соответствующей форме и должен содержать следующие основные разделы:

- 1) введение (обоснование испытания);
- 2) цели и задачи;
- 3) методика исследования (дизайн):
  - 3.1) характеристика испытуемого препарата, препарата сравнения и/или плацебо (дозировка, схемы введения препаратов);
  - 3.2) характеристика контингентов, включенных в испытания:
    - критерии включения в испытания;
    - критерии исключения из испытаний;
    - методика формирования основных и контрольных групп (рандомизация);
- 4) методика оценки безопасности, реактогенности;
- 5) методика оценки специфической активности;
- 6) методика оценки профилактической эффективности;
- 7) методика оценки лечебной эффективности;
- 8) учреждения, участвующие в проведении испытаний;
- 9) сроки проведения исследований;
- 10) информированное согласие и страховка субъектов исследования;
- 11) методы статистической обработки;
- 12) приложения.

#### Краткое содержание разделов протокола клинических исследований

Во **введении** должны быть кратко изложены данные о целесообразности разработки препарата, ожидаемых преимуществах его перед другими существующими препаратами

аналогичного назначения, наличии препаратов-аналогов за рубежом и их оценка, обоснованность проведения профилактики или лечения соответствующей инфекции с выделением особо подверженных заболеванию возрастных групп и контингентов населения (группы риска), назначение препарата.

Кроме того, в данном разделе исследователи указывают:

- название и код протокола исследования, сроки проведения клинического исследования;
- информацию о спонсоре и мониторе, их адреса;
- фамилию и должность лица, подписывающего протокол;
- фамилию, должность, адрес и телефон специалиста, отвечающего за проведение исследования со стороны спонсора;
- фамилию и должность исследователей, ответственных за проведение испытания; адрес и телефон исследовательского центра (исследовательских центров);
- фамилию, должность, адрес и телефон квалифицированного врача, несущего ответственность за принятие решений медицинского характера в исследовательском центре (если данное лицо не является исследователем);
- название и адреса клинических лабораторий, клинических и/или диагностических отделений и/или медицинских учреждений, участвующих в исследовании;
- учреждения и специалистов, осуществляющих мониторинг клинического исследования и аудит;
- название и адрес центра исследования, ответственного за проведение испытаний;
- название и описание исследуемого препарата;
- резюме результатов доклинических и клинических исследований;
- краткое описание известного и предполагаемого риска и пользы для испытуемых;
- описание и обоснование пути введения, дозировок, схемы и длительности применения исследуемого препарата;
- указание о проведении клинического испытания с соблюдением протокола и действующих нормативных требований;
- характеристику популяции испытуемых;
- ссылки на публикации и другие источники информации, использованные при планировании и обосновании исследования.

**Цели и задачи исследования.** В этом разделе протокола должны быть четко сформулированы цели и задачи различных этапов планируемых исследований. Промежуточные цели испытаний формируются, исходя из конкретных задач, решаемых на отдельных фазах исследований. Так, например, целью I фазы клинических испытаний ИЛП является возможность перехода к последующим этапам испытания препарата, при этом основными задачами этой фазы является изучение безопасности и реактогенности при введении его людям. Конечной целью клинических испытаний вновь разработанного препарата является его регистрация.

**Методика исследования (Дизайн)** включает следующие данные:

- описание вида/метода исследования (например, двойной слепой, плацебо-контролируемый метод параллельных групп) и схематическое изображение процедур и стадий исследования;
- характеристика испытуемого препарата и препарата сравнения (плацебо), их полное наименование и краткая характеристика, производственный регламент, по которому изготовлены серии (лабораторные, экспериментально-производственные), результаты контроля испытуемых серий в испытательных лабораториях или центрах, количество серий, подлежащих испытанию, их дозировки, схемы введения, расфасовки, маркировки и процедура учета препаратов.

Если испытание предусматривает применение нескольких доз, то необходимо указать, что его введение начинают с наименьшей дозы, и лишь после получения результатов, характеризующих его низкую реактогенность и безопасность, переходят к последующим дозировкам.

Если в испытаниях предусмотрено применение препарата сравнения и плацебо, приводят их характеристику и результаты контроля коммерческих серий препарата сравнения и плацебо в испытательных лабораториях;

– характеристика контингентов, включенных в испытания, их группировка (по возрасту, полу и т.д.), планируемая длительность участия испытуемых в исследовании, описание последовательности и продолжительности всех этапов испытания, включая период последующего наблюдения (если предусмотрен).

Изучение препарата на взрослых старше 60 лет и детях проводят после рассмотрения отчета испытания, проведенного на лицах в возрасте 18-50 лет. При испытании препарата в наблюдениях за детьми различного возраста, необходимо предусматривать поэтапное выполнение исследования, начиная со старшей возрастной группы.

Примерное возрастное формирование групп может быть следующим: 10-14 лет, 6-9 лет, 2-5 лет, 7-24 мес., первые 6 мес. жизни. При проведении испытаний препарата на ограниченных группах детей или подростков (15-17 лет) должны быть проинформированы надлежащим образом их родители или опекуны и получено письменное согласие каждого из них.

При формировании основных и контрольных групп следует предусматривать их равноценность по таким признакам, как пол, возраст, количество добровольцев, показатели специфического иммунитета (фоновый статус) и т.п. Необходимо также обозначить все сроки посещений добровольцами исследовательского центра для проведения им лабораторно-клинических обследований.

### **Включение и исключение испытуемых в исследование**

Критерии включения в испытания добровольцев зависят от целей и задач, решаемых на различных фазах клинических исследований.

При проведении клинического испытания препарата, предназначенного для профилактики инфекционных заболеваний, в исследование включаются здоровые лица, не имеющие противопоказаний, указанных в Инструкции по применению препарата. При этом возрастные группы отбираются исходя из задач, изложенных в Протоколе исследования. При проведении серологического скрининга в исследование включаются лица, не имеющие специфических антител (серонегативные).

При клиническом исследовании препарата, предназначенного для лечения, в исследование включаются лица, имеющие показания к применению соответствующего препарата.

Критерии исключения. В клиническое исследование не включаются лица, имеющие противопоказания к введению того или иного препарата в соответствии с Инструкцией по его применению.

Запрещается проведение клинического исследования ИЛП для медицинского применения с участием:

- детей-сирот и детей, оставшихся без попечения родителей;
- женщин в период беременности и в период грудного вскармливания, за исключением случаев, предусматривающих клиническое исследование препарата, предназначенного для указанных женщин, при условии необходимости получения информации только во время проведения соответствующих клинических исследований и принятия всех необходимых мер по исключению риска нанесения вреда женщине в период беременности или в период грудного вскармливания, плоду или ребенку;
- военнослужащих, за исключением случаев проведения клинического исследования ИЛП, специально разработанного для применения в условиях военных действий, чрезвычайных ситуаций, профилактики и лечения заболеваний и поражений, полученных в результате воздействия неблагоприятных химических, биологических, радиационных факторов. Клинические исследования такого ИЛП могут проводиться с участием военнослужащих, за исключением лиц, проходящих военную службу по призыву, с со-

блюдением требований, установленных настоящим Федеральным законом в отношении гражданских лиц;

- сотрудников правоохранительных органов;
- лиц, отбывающих наказание в местах лишения свободы, а также лиц, находящихся под стражей в следственных изоляторах.

Критерии выбытия (т.е. критерии прекращения введения исследуемого препарата в ходе испытания), а также процедуры, регламентирующие:

- обстоятельства и процедуры выбытия испытуемого из испытания;
- перечень и сроки получения данных по выбывшим испытуемым;
- метод замены испытуемых, если это предусмотрено;
- последующее наблюдение испытуемых, выбывших из испытания (или после преждевременного прекращения введения исследуемого препарата).

### **Методы оценки безопасности и реактогенности**

В настоящем разделе протокола должны быть внесены данные о всех планируемых методах оценки безопасности препарата, сроках обследования добровольцев, а также клинико-лабораторных методах исследования крови, мочи и т.п.

Описание методов оценки безопасности и реактогенности изложено в соответствующих разделах данного Руководства.

### **Методы оценки иммуногенности**

В разделе указывают планируемое количество добровольцев для проведения иммунологических исследований, сроки забора крови у добровольцев для постановки серологических реакций, используемые тест-системы. Указываются лаборатории, где будут проводиться исследования, описывается процедура хранения и доставки образцов. Необходимо также предусмотреть кодирование образцов перед их исследованием и обозначить специалистов, ответственных за шифровку и расшифровку материалов.

Подробное описание методов оценки иммуногенности излагается в разделе «Иммуногенность ИЛП» данного Руководства.

#### *Методика оценки профилактической эффективности*

Оценка проводится по показателям индекса и/или коэффициента эффективности, о чем подробно излагается в соответствующем разделе данного Руководства.

#### *Методика оценки лечебной эффективности*

В этом разделе необходимо указать по каким клинико-лабораторным или иным показателям будет оцениваться лечебный эффект ИЛП, описанный в разделе «Лечебная эффективность» данного Руководства.

#### *Учреждения, участвующие в проведении испытания*

В разделе указывают официальное наименование учреждения и отдела (клиники, лаборатории), принимающего непосредственное участие в проведении испытания. Ответственными за проведение испытаний являются аккредитованные медицинские учреждения.

#### *Сроки проведения испытания*

В разделе указывают срок начала и завершения испытания, а также срок представления отчета об испытаниях.

#### *Методы статистической обработки*

Описываются все необходимые методы статистической обработки данных, полученных по результатам проведения каждой фазы клинических исследований.

## **2.2. ИНДИВИДУАЛЬНАЯ РЕГИСТРАЦИОННАЯ КАРТА**

Индивидуальная регистрационная карта (ИРК) – документ, предназначенный для внесения в него информации по каждому испытуемому, предусмотренный протоколом клинического исследования (приложение 1).

Индивидуальные регистрационные карты составляются в соответствии со схемой введения исследуемого препарата, продолжительности курса введения и кратности. В ИРК необходимо указать дни наблюдения после каждого введения препарата. Необходимо предусмотреть графу «Перечень регистрируемых реакций» с указанием возможных местных и общих реакций на введение конкретного исследуемого препарата.

При заполнении ИРК обязательным условием является указание кода привитого. Код испытуемого – это уникальный идентификатор, присваиваемый исследователем каждому волонтеру для облегчения его анонимности и используемый вместо фамилии в ИРК и отчетах по исследованию.

Индивидуальный код присваивается испытуемому в процессе рандомизации.

Процедура рандомизации предусматривает регистрацию индивидуального кода с соблюдением его конфиденциальности.

Исследователь должен контролировать соблюдение принципа рандомизации в ходе испытания и следить, чтобы раскрытие кода осуществлялось только в соответствии с Протоколом клинического исследования.

Преждевременное открытие индивидуального кода возможно только в связи с развитием серьезного нежелательного явления (СНЯ). В данном случае исследователь должен немедленно зарегистрировать возможное нежелательное событие и сообщить об этом спонсору.

В ИРК необходимо указать полное название исследуемого препарата, его серию и дозу, или его шифр.

В индивидуальной карте фиксируются даты взятия крови у испытуемого, наличие поствакцинальных реакций, результаты всех анализов, дата каждого введения исследуемого препарата и другая необходимая информация.

Продолжительность наблюдения за добровольцами после введения препарата определяется видом ИЛП и кратностью его введения. При этом длительность наблюдения должна определяться Протоколом клинического исследования.

После окончания срока наблюдения за испытуемым, ИРК подписывается врачом, проводившим наблюдение с указанием даты.

Индивидуальные регистрационные карты привитых являются первичным документом при написании отчета о проведенных клинических исследованиях.

### **2.3. ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ**

Информированное согласие добровольцев – документально оформленное добровольное согласие испытуемого на участие в клиническом испытании после ознакомления со всеми его особенностями и условиями (приложение 2).

До начала участия в исследовании доброволец или его законный представитель, а также лицо, проводившее разъяснительную беседу с субъектом, должны подписать и датировать письменную форму информированного согласия, предварительно одобренную Комитетом по этике.

Документальное оформление информированного согласия основывается на нормативных требованиях, заложенных в Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (ВМА).

При составлении информированного согласия обращается внимание на следующие позиции:

- а) цель исследования;
- б) методы и схемы введения препарата;
- в) обязанности добровольца;
- г) ожидаемый риск для добровольца;
- д) ожидаемая польза для добровольца или ее отсутствие;

- е) компенсация или лечение, доступные добровольцу в случае причинения вреда здоровью в результате участия в исследовании;
- ж) планируемые выплаты добровольцу для его участия в исследовании, если это предусмотрено;
- з) планируемые расходы добровольца, связанные с его участием в исследовании, если таковые ожидаются;
- и) добровольный отказ от участия в исследовании на любом этапе без каких-либо санкций;
- к) соблюдение конфиденциальности всех данных о добровольце на всех этапах исследования, включая публикацию результатов;
- л) доступ к оригинальным медицинским записям субъекта разрешается мониторам, аудиторам, уполномоченным соответствующего органа с целью проверки процедур и данных клинического исследования, не нарушая конфиденциальности;
- м) своевременное информирование добровольца о новой информации, способной повлиять на его желание продолжить участие в исследовании;
- н) возможные обстоятельства или причины, по которым участие добровольца в исследовании может быть прекращено;
- о) предполагаемая длительность участия добровольца в исследовании;
- п) ориентировочное количество добровольцев, которое предполагается включить в исследование.

Перед получением информированного согласия исследователь предоставляет волонтеру достаточное количество времени и возможность для получения более подробной информации об исследовании.

Решение об участии или отказе от участия в исследовании принимается лично добровольцем.

Запрещается принуждать добровольца или использовать некорректные методы воздействия с целью склонить его к продолжению участвовать в исследовании в случае отказа.

Письменная форма информированного согласия должна быть доступна и понятна добровольцу с минимальным содержанием специальных терминов.

Письменная форма информированного согласия по мере появления новой важной информации дополняется или исправляется.

Доброволец должен быть своевременно ознакомлен с новой информацией, способной повлиять на его желание продолжить участие в исследовании. Передача такой информации оформляется документально.

Перед включением в исследование доброволец должен получить подписанный датированный экземпляр письменной формы информированного согласия.

При необходимости проведения клинических исследований с участием детей, не достигших совершеннолетнего возраста, процедуру информированного согласия проходят родители детей. Письменная форма информированного согласия датируется и подписывается одним из родителей.

## **2.4. ОТЧЕТ О РЕЗУЛЬТАТАХ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

Отчет о результатах клинического исследования – документ, который включает в себя все результаты, полученные в ходе выполнения протокола испытаний, описание клинических и статистических методов исследования, а также результатов анализа всех проведенных исследований.

В зависимости от сроков проведения клинического исследования отчеты могут быть промежуточные и итоговые. Промежуточный отчет составляется по результатам клинического исследования, проведенного за определенный промежуток времени и соответствует определенной фазе (этапу) исследования. Итоговый отчет оформляется по исте-

чению всего срока проведения клинического исследования и включает в себя результаты испытания согласно Протоколу клинического исследования.

В соответствии с Правилами надлежащей клинической практики (GCP) отчет о клиническом исследовании должен иметь следующую структуру:

1. Титульный лист, на котором указывается название клинического исследования, дата его начала и завершения, Ф.И.О. главного исследователя.
2. Оглавление.
3. Список сокращений и определение терминов.
4. Этические аспекты проведения клинического исследования (одобрение НЭК на проведение исследования, этические принципы исследования, получение информированного согласия пациента).
5. Исследователи и административная структура исследования.
6. Введение.

Во введении должно быть указано, в соответствии с каким документом проведено испытание, наименование учреждений, принимавших участие в его выполнении, соответствие объема проведенных исследований утвержденному Протоколу. В случае неполного выполнения Протокола клинических исследований или замены каких-либо методов исследования должно быть приведено соответствующее обоснование.

7. Цель и задачи исследования, определенные Протоколом клинических испытаний.

8. Методика исследования (Дизайн).

В данном разделе указывается информация по следующим позициям:

- испытуемый препарат – указывают номера серий препарата, примененных при проведении испытания, срок их годности, метод введения, дозу и схему применения, содержание действующего начала и вспомогательных веществ (в весовых единицах, количестве бактериальных клеток, ТЦД<sub>50</sub> и т.д.) в 1 мл препарата (по паспортным данным), другие необходимые сведения (например, максимально допустившийся срок хранения растворенного препарата), которые могут иметь значение при формировании протокола последующего этапа испытания препарата. В данный раздел включают также соответствующие сведения о препарате сравнения или плацебо;

- характеристика контингента – включает сведения об общем количестве лиц, вошедших в состав основных и контрольных групп, распределении их по возрасту и полу, необходимо указать метод их рандомизации, а также сроки проведения (визиты) всех клинико-лабораторных обследований добровольцев.

9. Результаты клинического испытания.

Результаты проведенных испытаний должны быть достоверны и репрезентативны для оценки показателей реактогенности, безопасности, антигенной активности исследуемого препарата, его лечебной эффективности, обоснованности дозы и схемы применения.

Результаты анализа сведений, внесенных в индивидуальные карты привитых, целесообразно суммировать в виде сводной таблицы, построенной на основе «Карты наблюдения», раздельно для каждого вводимого препарата.

В разделе «Оценка безопасности» препарата приводятся следующие сведения:

- отмена повторного введения препарата из-за сильной или необычной реакции на предшествовавшую прививку;
- активное обращение за медицинской помощью в течение периода наблюдения;
- выдача больничных листов.

При этом указывают диагноз и дату заболевания, его длительность, а в случае поствакцинальных реакций – проводимую медикаментозную терапию. Раздел заканчивают кратким заключением по результатам испытаний.

Результаты анализа показателей иммунологической эффективности вакцин приводят путем сопоставления результатов определения специфических антител в сыворотках крови людей до и после вакцинации в разные сроки, а также при сравнении этих данных с аналогичными, полученными в те же сроки при обследовании лиц, привитых плацебо или препаратом сравнения.

#### 10. Выводы и предложения.

В разделе должно быть сформулировано заключение о достаточности полученных материалов для решения вопроса о последующем изучении препарата или представлении препарата на регистрацию.

#### 11. Приложения.

Обязательным приложением к отчету являются индивидуальные карты привитых, таблицы, графики и схемы по результатам проведенного анализа. В случае, если в отчете имеются ссылки на НТД, РД и др. документы или литературные источники, их полное наименование представляют как справочное приложение.

К отчету прилагается документация по учету и расходу исследуемого иммунобиологического препарата. Отчет утверждается руководителем учреждения испытательного центра, подписывается главным исследователем и авторами, участвующими в испытаниях, скрепляется соответствующей печатью. Отчет направляется в разрешительную инстанцию в 2-х экземплярах, с сопроводительным письмом, подписанным руководителем учреждения.

## 2.5. БРОШЮРА ИССЛЕДОВАТЕЛЯ

Брошюра исследователя (БИ) – это сводное изложение доклинических и клинических данных по исследуемому препарату, которые имеют значение для принятия решения о целесообразности проведения его клинического исследования. БИ содержит информацию, способствующую пониманию и соблюдению ключевых положений протокола исследования. В данном документе отражаются такие аспекты, как доза препарата, частота/периодичность и способ его введения, процедура оценки безопасности изучаемого препарата для испытуемых.

Информация излагается в краткой, доступной, объективной и лишенной рекламного оттенка форме. Такое изложение БИ позволяет любому заинтересованному специалисту разобраться в ней и сформировать собственное мнение относительно целесообразности планируемого исследования, основанное на сопоставлении риска и пользы для испытуемых.

Составляет Брошюру исследователя, как правило, медицинский эксперт, ее содержание согласовывается с соответствующими специалистами.

Содержание и объем доступной информации будут зависеть от стадии разработки изучаемого препарата. Брошюра исследователя может быть менее подробной, если исследуемый препарат уже применяется в практике и знаком специалистам. В некоторых случаях вместо БИ может использоваться стандартный индивидуальный листок или инструкция по применению препарата, при условии, что они содержат обновленную, достаточно подробную информацию о всех свойствах изучаемого препарата.

В случае, если разрешенный ИЛП изучается по новому показанию, должна быть составлена брошюра исследователя для данного показания.

БИ пересматривается не реже одного раза в год и при необходимости исправляется и дополняется. По мере поступления новой значимой информации БИ может пересматриваться и более часто.

Согласно требованиям Качественной клинической практики (GCP) о поступающей новой информации о препарате необходимо ознакомить исследователей, Экспертный совет/Комитет по этике и/или разрешительные инстанции. Только после этого вновь полученная информация будет включена в новую редакцию БИ.



Ответственность за предоставление исследователю текущей редакции Брошюры несет спонсор, а исследователь отвечает за ее представление в соответствующий Экспертный совет/Комитет по этике. Если спонсором испытания является исследователь, то он должен рассмотреть возможность получения Брошюры от изготовителя препарата. В случае представления изучаемого препарата самим спонсором-исследователем, последний должен довести необходимую информацию до участвующих в проведении исследования сотрудников. В редких случаях, когда составление традиционной БИ не представляется возможным, в качестве альтернативы спонсор-исследователь должен представить в разделе протокола исследования «Обоснование исследований» необходимую информацию.

В содержании Брошюры исследователя дается краткое описание (резюме) наиболее значимых свойств изучаемого препарата в контексте соответствующей стадии клинического изучения.

Во **введении** указывается полное название изучаемого препарата, все активные компоненты, вид ИЛП по классификации, обоснование для изучения препарата, показания к его применению.

Описываются физические, химические, фармацевтические свойства и лекарственная форма компонентов исследуемого препарата, представляется инструкция по его применению.

**Раздел «Доклинические исследования»** начинается с краткой информации о результатах доклинических исследований препарата. Описываются использованные методы, результаты экспериментов и их обсуждение о возможных неблагоприятных эффектов у человека. Кроме того, в данном разделе указываются необходимые сведения о животных, привлекаемых к эксперименту.

Результаты доклинических исследований в зависимости от особенностей ИЛП должны отражать сведения по фармакокинетике и метаболизму изучаемого препарата у животных, токсикологии, канцерогенности, генотоксичности и др.

**Раздел «Клинические исследования»** начинают с введения, где дается подробное описание результатов исследования изучаемого препарата на человеке, включая данные по фармакокинетике, фармакодинамике, дозозависимости, безопасности и эффективности. Приводится краткое резюме каждого проведенного клинического исследования, а также сведения пострегистрационного опыта применения препарата.

При завершении соответствующей фазы клинических исследований рекомендуется представить сводные отчеты по безопасности и эффективности изучаемых препаратов у разных групп испытуемых. По результатам проведения клинических исследований дается детальная характеристика побочных эффектов. Исследователями обсуждается риск и побочные эффекты, которые можно ожидать, основываясь на существующем опыте применения исследуемого препарата. Должны быть описаны меры предосторожности и рекомендуемые методы обследования.

В Брошюре исследователя представляется также информация о пострегистрационном опыте применения исследуемого препарата, который уже зарегистрирован и применяется в других странах. Описываются доза, схема и пути введения препарата, его лекарственная форма и побочные эффекты. Должен быть представлен перечень стран, где зарегистрирован данный ИЛП, а также, в которых заявителю было отказано в регистрации препарата или препарат был изъят из обращения.

В заключении обобщается информация о результатах доклинических и клинических исследований с выводами и заключением о целесообразности проведения тех или иных клинических испытаний.

## ГЛАВА 3

### ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ОТДЕЛЬНЫХ ЭТАПОВ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

*СОСТАВИТЕЛИ: д.м.н., проф. М.А. Горбунов, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравоуразвития России, Центр экспертизы и контроля ИЛП*

Клинические исследования лекарственных препаратов для медицинского применения в соответствии с Законом № 61-ФЗ « Об обращении лекарственных средств» и в том числе международные многоцентровые, многоцентровые, пострегистрационные, проводятся для государственной регистрации лекарственных препаратов и иного назначения в одной или нескольких медицинских организациях в соответствии с правилами клинической практики, утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти, соответственно в следующих целях:

1. Установление безопасности лекарственных препаратов для здоровых добровольцев и (или) переносимости их здоровыми добровольцами, за исключением исследований лекарственных препаратов, произведенных за пределами Российской Федерации.

2. Подбор оптимальных дозировок лекарственного препарата и курса лечения для пациентов с определенным заболеванием, оптимальных доз и схем вакцинации иммунобиологическими лекарственными препаратами здоровых добровольцев.

3. Установление безопасности лекарственного препарата и его эффективности для пациентов с определенным заболеванием, профилактической эффективности иммунобиологических лекарственных препаратов для здоровых добровольцев.

4. Изучение возможности расширения показаний для медицинского применения и выявления ранее неизвестных побочных действий зарегистрированных лекарственных препаратов.

Реализация указанных в Законе целей клинических исследований лекарственных препаратов, в том числе ИЛП, подразделяются на отдельные этапы (фазы). Каждый этап представляет собой самостоятельное исследование. Клинические исследования I, II и III этапов проводятся в рамках регистрации ИЛП, исследования IV этапа являются пострегистрационными.

Исследования I этапа (фазы) проводятся на ограниченной (от 20 до 80 человек) группе здоровых добровольцев. Основной целью этого исследования является оценка безопасности, переносимости и реактогенности препарата. Данные исследования предпочтительно проводить в условиях стационара под постоянным наблюдением медицинского персонала. В исследованиях I этапа определяются показатели безопасности и поствакцинального иммунного ответа при использовании максимальной дозы препарата. После получения результатов, подтверждающих безопасность препарата на I этапе испытаний, проводятся расширенные исследования ИЛП по изучению показателей его безопасности и эффективности, т.е. II этап клинических исследований.

При проведении этого этапа клинических испытаний последовательно решаются следующие задачи:

- определение оптимальной дозы и схемы введения препарата по показателям безопасности, переносимости и эффективности;

- определение оптимальной дозы и возрастных схем введения препарата, если препарат предназначен для профилактики и лечения взрослых и детей различного возраста.

Вышеперечисленные задачи могут выполняться поэтапно (фазы Па и Пб).

Обязательными условиями проведения клинических испытаний II этапа является наличие основной группы (получающие исследуемый препарат) и контрольной, в которой добровольцам вводится либо плацебо, либо препарат сравнения, т.е. испытания должны быть контролируемые. Добровольцы, включенные в состав основной и контрольной групп, должны быть рандомизированы по полу, возрасту и т.п. При этом показатели эффективности (иммуногенность, лечебная или профилактическая эффективность) и переносимость вновь разработанного препарата (препарата, представленного на регистрацию) сравниваются либо с плацебо, либо с препаратом сравнения (однонаправленным препаратом, зарегистрированным в стране с уже охарактеризованными показателями безопасности и эффективности).

Численность контингентов, включаемых в испытания на этом этапе, определяется целями и задачами исследования и должна быть достаточной для получения статистически достоверных данных для оценки изучаемых показателей, но, как правило, не менее 100 человек в каждой из наблюдаемых групп.

При целом ряде инфекционных заболеваний существуют, так называемые, защитные титры антител, выраженные, в том числе, в международных единицах, что позволяет оценить защитные потенции вакцин по иммунологическим показателям, установленные в ходе проведения II фазы испытаний.

Исследования III этапа для ИЛП – это оценка профилактической и/или лечебной эффективности, которые являются рандомизированными контролируемыми и проводятся с участием большого количества добровольцев. Задача этих исследований оценить защитные или лечебные потенции ИЛП в условиях, приближенных к тем, в которых препараты будут использоваться в случаях разрешения их медицинского применения.

III этап испытаний профилактических препаратов проводится при условии невозможности оценить эффективность препарата по показателям иммуногенности, т.е. при отсутствии данных о корреляции показателей иммуногенности с протективной активностью.

Как правило, для получения более объективной и достоверной информации клинические исследования на II и III этапах проводятся с участием 2-х или большего количества исследовательских центров по единому протоколу (один из вариантов – многоцентровые клинические исследования).

IV этап – проведение пострегистрационных исследований, в которых изучаются показатели безопасности и эффективности препаратов, внедренных в практику здравоохранения. В задачи пострегистрационных испытаний входит: выявление редких побочных эффектов от применения препаратов; расширения показаний к применению препаратов; разработка эпидемиологически обоснованной тактики применения вакцин; оценка экономической эффективности применения препарата, уточнение схем введения и т.п.

Более подробная информация о фазах клинических испытаний представлена в разделах Руководства, посвященных особенностям клинических испытаний отдельных ИЛП.

Качество, достоверность и объективность результатов клинических испытаний во многом зависят от квалификации исследователей и от оснащенности исследовательских центров и лабораторий необходимым оборудованием, на базе которых проводятся клинические исследования.

В соответствии с Федеральным законом ФЗ-61 от 12 апреля 2010 г. «Об обращении лекарственных средств» клинические исследования лекарственных препаратов для медицинского применения проводятся в медицинских организациях, аккредитованных уполномоченным Федеральным органом исполнительной власти в порядке, установленном Правительством Российской Федерации.

Естественно, что выбор исследователей и клинических учреждений определяется, исходя из специфики ИЛП, а также целей и задач при проведении отдельных фаз клинических испытаний. Так, в частности, при проведении I фазы клинических испытаний ИЛП целесообразно проводить на клинических базах, обладающих возможностями осуществлять необходимые клинические и инструментально-лабораторные исследования по определению показателей безопасности ИЛП. При этом исследователи, проводящие испытания, должны обладать профессиональными знаниями, позволяющими оценить результаты клинико-лабораторных обследований добровольцев, включенных в исследования.

При проведении II фазы клинических испытаний ИЛП специалисты клинических центров должны провести оценку не только показателей безопасности, но и эффективности препаратов. При этом, по сравнению с I фазой испытания значительно увеличивается численность контингентов, включенных в испытания, а также лабораторных тестов по определению специфических показателей эффективности ИЛП. Специалисты, проводящие испытания, должны владеть методами рандомизации при формировании основных и контрольных групп, кодирование препаратов и других биологических материалов. Исследователи, ответственные за реализацию протокола клинических испытаний, должны владеть знаниями, позволяющими обобщать и анализировать результаты показателей как безопасности, так и эффективности испытуемого препарата. Кроме того, необходимо при планировании испытаний включать лабораторные базы и испытательные лабораторные центры, способные на современном уровне выполнять серологические, вирусологические, бактериологические и др. исследования. С учетом специфики определения тех или иных показателей, необходимо использовать диагностические тест-системы, с установленной чувствительностью и специфичностью.

При проведении II фазы клинических испытаний вакцин клинические базы должны быть аккредитованы в области проведения вакцинопрофилактики, если испытания проводятся в наблюдениях за детьми различного возраста, необходимо предусматривать обязательное участие специалистов-педиатров.

Учитывая, что клинические исследования в детской популяции требуют строгого учета специфических особенностей детского организма, следует проводить их на базе педиатрических центров, оснащенных всем необходимым оборудованием при участии педиатров различных специальностей.

Особое значение следует уделять выбору исследовательских центров и специалистов-исследователей при проведении оценки профилактической эффективности вакцин, т.е. при реализации III фазы клинических испытаний, основной задачей которой является сравнительная оценка заболеваемости среди привитых (основная группа) и среди не привитых (контрольная группа).

При организации и проведении этой фазы испытания необходимо предусмотреть участие в них специалистов-эпидемиологов и врачей-инфекционистов. В связи с этим в исследовательские центры, ответственные за проведение подобного рода клинических испытаний, должны быть включены как клинические учреждения, так и учреждения санитарно-эпидемиологической службы.

## ГЛАВА 4

### ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ИЛП В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

*СОСТАВИТЕЛИ: д. м. н., проф. М.А. Горбунов, к. м. н. В.Н. Икоев, к. м. н. Г.А. Ельшина, д. м. н., проф. Н.Ф. Никитюк, М.В. Соловьева, к. м. н. Н.А. Озерецковский, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравоуразвития России, Центр экспертизы и контроля ИЛП*

#### 4.1. БЕЗОПАСНОСТЬ И ПЕРЕНОСИМОСТЬ

Безопасность и/или переносимость – это характеристика ИЛП, основанная на анализе возможного риска причинения вреда организму в результате введения различных доз исследуемого препарата.

Изучение безопасности препаратов является одной из важнейших целей клинических исследований ИЛП.

Учитывая широкое применение ИЛП в практике здравоохранения, изучение безопасности при проведении клинических испытаний является приоритетным направлением.

Оценка показателей безопасности новых препаратов начинается при проведении доклинических исследований на чувствительных, к предполагаемому возбудителю, животных, путем отработки дозы и схемы иммунизации с последующим перерасчетом выбранной оптимальной дозы при введении ее человеку с использованием, так называемого, «коэффициента перерасчета».

В рамках I фазы клинического исследования по параметрам безопасности, изучаются выбранные дозы и схемы препарата на добровольцах численностью не менее 20 человек в каждой группе.

Если испытания предусматривают изучение нескольких доз препарата, то его введение начинают с наименьшей дозы, и лишь после получения результатов, характеризующих низкую реактогенность и безопасность данной дозы, переходят к более высоким дозировкам. При этом испытание каждой дозы препарата следует начинать не более, чем на 5 добровольцах. Таким образом, выбирают ту максимальную дозу, которая удовлетворяет требованиям переносимости, реактогенности и безопасности препарата.

При переходе к дальнейшим этапам исследования безопасность препарата изучается на более расширенном контингенте добровольцев.

Изучение препарата на детях и лицах старше 60 лет проводится после рассмотрения результатов испытания в возрастных группах 18-50 лет.

При испытании препарата на детях необходимо предусмотреть поэтапные исследования, начиная со старших возрастных групп, придерживаясь следующих возрастных градаций: 10-14 лет, 6-9 лет, 2-5 лет, 7 мес.-24 мес. и первые 6 месяцев жизни.

При проведении II и III фаз исследования с целью изучения безопасности целесообразно проводить контролируемые исследования с применением препарата сравнения (референс-препарат) или плацебо. Изучение параметров безопасности ИЛП продолжают и при проведении IV фазы пострегистрационных испытаний.

С целью изучения безопасности ИЛП необходимо проведение лабораторно-инструментального обследования каждого субъекта (добровольца), включенного в клиническое испытание.

Данное обследование включает следующий перечень обязательных исследований:

- клинический анализ крови с развернутой гемоцитогаммой с определением тромбоцитов (для всех возрастных групп);
- общий анализ мочи, суточный анализ мочи (по Аддису – у взрослых и детей старшего возраста; по Нечипоренко – у детей младшего возраста);
- биохимические исследования сыворотки крови: определение глюкозы, мочевины (остаточного азота), билирубина, АЛТ, АСТ, ЛДГ, щелочной фосфатазы (все возраста), протромбина (протромбинового индекса), холестерина, В-липопротеинов (у взрослых);
- измерение артериального давления (с трех лет); снятие ЭКГ, ЭХО-КГ (все возраста).

Необходимость проведения дополнительных исследований определяется характером и способом введения испытуемого препарата, а также результатами его доклинического изучения. Так, при испытании вакцин, содержащих бактериальные липополисахариды, должна быть предусмотрена реоэнцефалография. Перечень исследований сердечно-сосудистой системы у детей старшего возраста и взрослых должен быть дополнен реовазографией, а для вакцин против респираторных инфекций, а также вводимых аэрозольно – исследованием функции внешнего дыхания (с трех лет).

Первое обследование проводят за 1-3 суток до вакцинации. При испытании инактивированных вакцин повторные исследования проводят после каждой прививки в следующие сроки:

- измерение АД – в течение 5 суток;
- снятие ЭКГ и др. исследования сердечно-сосудистой системы в первые 3-4 суток;
- функция внешнего дыхания в первые 24-28 часов и на 7-8 сутки;
- обследование нервной системы в течение 48-72 часов;
- клиническое и биохимическое исследование крови, анализ мочи в первые 48-72 часов.

При испытании живых вакцин клинико-лабораторные исследования проводят однократно в сроки максимальной выраженности общей или местной специфической поствакцинальной реакции. С этой целью целесообразно вначале определить показатели реактогенности. Если при этом будет установлено отсутствие специфических общих и местных реакций, лабораторно-инструментальное обследование следует осуществить в сроки, равные максимальному инкубационному периоду инфекционного заболевания (в случае, если способ введения вакцины соответствует естественному пути заражения); или минимальному инкубационному периоду (в случае, если препарат вводят методом, при котором минуются естественные факторы защиты, например подкожно, при испытании вакцины против инфекции с воздушно-капельным механизмом передачи).

В случае если у привитого какой-либо из определяемых показателей будет выходить за пределы нормальных величин, исследование повторяют через 6-7 суток, а данный субъект отводится от последующих прививок испытуемым препаратом.

Помимо указанного, в «Картах наблюдения» регистрируются все случаи обращения за медицинской помощью в течение периода наблюдения за привитыми, а также последующих 3-6 мес. с указанием диагноза.

Одним из главных направлений изучения безопасности ИЛП является определение иммунологической безопасности.

Развитие специфического иммунного ответа при вакцинации сопровождается неспецифическими изменениями иммунной системы, которые могут привести к снижению резистентности организма к другим инфекционным агентам, что сопровождается появлением иммунодефицитных состояний и аллергических заболеваний. В связи с этим, общая схема испытания новых вакцин предусматривает изучение иммунологической безопасности на доклиническом и клиническом уровнях.

Изучение иммунологической безопасности ИЛП на людях проводят после рассмотрения материалов доклинических испытаний препарата в следующей последовательности:

- проведение клинико-лабораторных исследований на ограниченной группе людей в рамках I фазы программы испытания по изучению специфической активности лабораторных серий препарата;
- выявление иммунозависимых заболеваний у вакцинированных в контролируемых исследованиях в рамках II-III фазы клинических испытаний;
- изучение иммунологической безопасности в пострегистрационном периоде исследования препарата (IV фаза).

Длительность наблюдения зависит от выявления сроков восстановления возможных иммунологических нарушений.

С целью изучения иммунологической безопасности ИЛП проводятся исследования в следующих направлениях:

- определение изменения уровня иммунологической реактивности на неродственные (относительно испытуемого препарата) инфекционные антигены;
- выявление аллергических и аутоиммунных реакций;
- определение изменений в системе иммунокомпетентных клеток (иммунном статусе).

В рамках данных направлений проводятся иммунологические исследования, которые включают: оценку иммунного статуса, выявление изменений иммунологической реактивности, определение аллергических и аутоиммунных реакций.

Состояние иммунного статуса определяют на основании определения:

- количества и относительного содержания лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов (традиционными методами);
- фагоцитарной активности лейкоцитов;
- численности и относительного содержания субпопуляции Т- и В-лимфоцитов;
- содержания в сыворотке крови иммуноглобулинов основных классов.

По результатам иммунологических исследований выявляются иммунозависимые заболевания у вакцинируемых, развившиеся в результате неспецифических изменений иммунной системы после вакцинации.

Влияние вакцины на иммунологическую реактивность организма в отношении неродственных инфекционных антигенов оценивают по изменению уровня анамнестических антител, образовавшихся ранее в ходе вакцинации против распространенных инфекционных заболеваний (клеточный иммунитет).

Аллергизирующее воздействие вакцин оценивается по уровню общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови. Аутоиммунные реакции выявляют в серологических реакциях на тканевые антигены.

Вакцинный препарат в плане его неспецифического влияния на иммунную систему должен удовлетворять следующим требованиям:

- продолжительность изменений иммунологических показателей не должна превышать 45 дней с момента каждого введения вакцины;
- изменения величины показателя численности и функциональной активности иммунокомпетентных клеток не должны быть больше или меньше, чем в 1,5 раза по сравнению с исходной их величиной и величиной аналогичного показателя в группе, получавшей плацебо и обследованной в те же сроки.

Иммунологическая безопасность ИЛП должна также оцениваться по выявлению случаев инфекционных и соматических заболеваний, в том числе аллергической и аутоиммунной природы в опытной и контрольной группах. Длительность наблюдения за вакцинируемыми должна быть не менее 6 месяцев после введения препарата.

## 4.2. РЕАКТОГЕННОСТЬ

Реактогенность ИЛП относится к, так называемым, ожидаемым реакциям, т.е. свойство препарата вызывать местные или общие реакции организма.

Ожидаемые реакции – реакции организма в ответ на введение антигенов или других компонентов, входящих в состав ИЛП (местные или системные). Как правило, подобные

реакции прогнозируемы, носят кратковременный характер и не причиняют ущерб здоровью лицам, получившим препарат. Количественные показатели ожидаемых реакций оцениваются по результатам клинических исследований и вносятся в Инструкцию по применению ИЛП.

Реактогенные свойства препарата определяются в течение первых 5-7 дней после каждого введения препарата, при необходимости наблюдение продолжается весь период наблюдения.

Оценка реактогенности ИЛП зависит от способа его введения: накожное (н/к), внутривенное (в/к), подкожное (п/к), внутримышечное (в/м), через ротовую полость (per os), интраназальное. Кроме того, необходимо учитывать место введения препарата: средняя треть плеча (дельтовидная мышца), подлопаточная область спины, передняя поверхность бедра, слизистые оболочки ротовой и носовой полостей.

Реактогенные свойства ИЛП оцениваются по показателям местных (область места введения препарата) и общих (системные реакции организма на введение препарата) реакций.

Местные реакции оцениваются по следующим признакам:

- гиперемии в месте введения препарата;
- болезненности (интенсивность, сроки);
- припухлости;
- отеку (инфильтрату);
- увеличению регионарных лимфатических узлов;
- изменению со стороны слизистых оболочек, наличию папулы, везикулы, эрозии.

Учет местных реакций проводится в зависимости от вида препарата и способа его введения.

Местные реакции после введения корпускулярных и химических бактериальных вакцин могут быть классифицированы по диаметру инфильтрата: слабая (до 2,5 см), средняя (от 2,6 до 5 см), сильная (более 5 см или наличие лимфангоита) реакции.

При аэрозольном или интраназальном способах иммунизации местные реакции проявляются в виде катаральных явлений, конъюнктивитов; при энтеральном введении препарата – реакциями со стороны желудочно-кишечного тракта.

Наблюдение за местными реакциями ограничивается первыми 5-7 сутками после введения ИЛП. По истечении данного срока местные реакции, как правило, проходят. В день прививки местную реакцию регистрируют через 20 мин. и 5-8 часов после введения препарата. В некоторых случаях болезненные уплотнения в местах введения препарата сохраняются до месяца.

В случае, если при иммунизации живыми вакцинами специфическая местная реакция является обязательным условием развития вакцинального процесса, наблюдение продолжают до ее исчезновения или полного прекращения активной фазы.

К общим поствакцинальным реакциям относятся: повышение температуры тела, ухудшение самочувствия, головная боль, головокружение, снижение аппетита, бессонница, тошнота, рвота, диспепсия, слабость, потливость, боли в суставах, животе, судороги и др. Кроме того, возможны аллергические реакции, которые сопровождаются появлением сыпи, артралгией и др. По срокам появления аллергические реакции делятся на немедленные (в течение 1 часа), замедленные (через 24-48 часов) и смешанные.

Температурные реакции по степени повышения температуры разделяются на: слабые (37,0-37,5 °C), средние (37,6-38,5 °C) и сильные (выше 38,5 °C).

Учет общих реакций проводит врач на основании измерения температуры тела, осмотра и опроса привитого, проводимых в соответствии с «Индивидуальной картой привитого».

Наблюдение за общими реакциями осуществляют после каждой прививки в течение 5-7 суток (инактивированные вакцины) или в течение максимальной продолжительности инкубационного периода инфекционного заболевания (живые вакцины). В день при-



вивки термометрию и опрос осуществляют до, а также через 20 минут и 5-8 часов после вакцинации, в последующие дни – 2 раза в сутки (утром и вечером).

Побочное действие препарата оценивается также по наличию *поствакцинальных осложнений*, которые разделяются на: токсические, аллергические и неврологические. Характер поствакцинальных осложнений зависит от свойства препарата, его вида и способа введения. К токсическим поствакцинальным осложнениям относятся: септические состояния, генерализованная инфекция. Аллергические осложнения характеризуются полиморфной сыпью, отеком Квинке, артралгиями, анафилактическим шоком и чаще регистрируются после повторного введения вакцин. Неврологические осложнения развиваются вследствие поражения центральной и периферической нервной системы (энцефалит, неврит, полиневрит).

Поствакцинальные осложнения могут быть следствием:

- низкого качества вакцины;
- обострения хронических заболеваний;
- присоединения интеркуррентных инфекций;
- особенностей реактивности организма.

Истинные серьезные поствакцинальные осложнения встречаются крайне редко.

С целью предупреждения развития поствакцинальных реакций и осложнений, не более чем за две недели до вакцинации, проводится скрининг добровольцев с забором крови и мочи на определение исходных показателей состояния организма. Кроме того, добровольцы подвергаются тщательному обследованию терапевтом и другими специалистами. Все «фоновые» показатели обследования вносятся в Индивидуальную регистрационную карту привитого.

В перечень лабораторных исследований, определяющих побочное действие ИЛП, должны быть включены:

- а) полный клинический анализ крови с подсчетом всех элементов крови и определением СОЭ;
- б) определение активности печеночных ферментов – АСТ, АЛТ, тимоловая проба, общий белок, общий билирубин, холестерин, сахар, мочевины, протромбиновый индекс;
- в) общий анализ мочи – удельный вес, белок, сахар, эритроциты, лейкоциты, микроскопия;
- г) показатели сердечной деятельности – ЭКГ, пульс, кровяное давление, УЗИ (при необходимости);
- д) при введении живых аттенуированных и инактивированных вирусных вакцин – определение возможности реверсии патогенных свойств вируса вакцины и выхода его во внешнюю среду.

Биохимические показатели крови и анализ мочи определяются через 2 дня и через 2 недели после каждой вакцинации.

Поствакцинальные реакции и осложнения относятся к побочному действию ИЛП, которые могут быть классифицированы на 4 типа:

- побочные реакции, вызванные введением ИЛП;
- реакции, спровоцированные введением ИЛП (в основном в отдаленные сроки);
- побочные реакции, связанные с ошибками при введении ИЛП;
- заболевания, по времени случайно совпадающие с введением ИЛП.

Различают следующие виды побочного действия вакцин:

Вакцинальный инфекционный процесс – возникает после введения живых бактериальных и вирусных вакцин и зависит от специфической активности вакцинных штаммов. Причинами возникновения такого осложнения могут быть: остаточная вирулентность штамма, возможная реверсия его патогенных свойств и иммунодефицитное состояние привитого.

Туморогенное действие вакцин – основано на способности ДНК вызвать инактивацию супрессорных онкогенов или активацию протоонкогенов после ее интеграции с

клеточным геномом. Проблема онкогенной опасности существует и для вновь разрабатываемых ДНК вакцин.

Аллергические состояния могут возникать в случае наличия в составе вакцины субстанций, обладающих сенсибилизирующими свойствами. Одни из них вызывают преимущественно немедленную аллергию, другие – аллергическую реакцию замедленного типа.

Аутоиммунные состояния после введения вакцин нельзя считать доказанными. Вместе с тем, некоторые препараты, например, коклюшная вакцина, обладают поликлональным действием и могут индуцировать или стимулировать образование аутоантител и специфических клонов лимфоцитов, направленных против собственных клеток организма.

Причиной возникновения аутоиммунных расстройств может быть мимикрия с наличием перекрестных антигенных структур между вакциной и собственными клеточными структурами организма.

Обострение существующих заболеваний происходит в результате провоцирующего действия вакцины, что влияет на обострение хронических болезней латентных инфекций (ревматизм, гепатит, бронхиальная астма и пр.).

Психогенное действие ИЛП возможно у лиц с ярко выраженными психоэмоциональными свойствами, что усиливает местные и общие реакции, вплоть до обморочных состояний, возникающих на инъекцию вакцины. Прием успокаивающих средств подавляет развитие отрицательных реакций в поствакцинальный период.

Иммунофармакологическое действие ИЛП – обусловлено образованием различных медиаторов иммунного ответа, в том числе провоспалительных цитокинов, которые обладают фармакологическим действием, что проявляется в ряде случаев развитием клинической симптоматики.

Каждый доброволец должен быть информирован, что при развитии нежелательных явлений (НЯ) ему следует сразу же обратиться к врачу-исследователю, который совместно с главным исследователем примет решение о дальнейших мероприятиях по лечению осложнений, вплоть до госпитализации.

Все побочные или нежелательные явления как и сведения по реактогенности должны быть занесены в Индивидуальную регистрационную карту с указанием даты начала, интенсивности и их прекращения. О серьезности НЯ исследователь сообщает руководителю исследования, спонсору и в этический комитет. Связь побочного действия с применением препарата будет определена комиссионно (руководитель исследования, врач-исследователь, спонсор) на основе следующих определений:

- *не взаимосвязанные* – побочные действия, явно объясняющиеся другой причиной;
- *отдаленно связанные* – побочные действия, с большей вероятностью объясняющиеся другими причинами, чем введением препарата;
- *возможно взаимосвязанные* – введение препарата и появление побочного действия соотносятся по времени и объясняются как возможными причинами от введения препарата, так и не связанными с ним;
- *вероятно взаимосвязанные* – введение препарата и появление побочного действия соотносятся по времени и с большей вероятностью объясняются приемом препарата, чем другими факторами;
- *определенно взаимосвязанные* – введение препарата и побочное действие соотносятся по времени и объясняются приемом препарата.

*Нежелательное явление* – любое неблагоприятное изменение в состоянии здоровья пациента или субъекта клинического исследования, получающего ИЛП независимо от причинной связи со специфическим действием препарата. Таким образом, нежелательное явление – это:

- непреднамеренное появление неблагоприятного объективного или субъективного симптома;
- появление аномальных значений лабораторных анализов (как разновидность объективных показателей);
- появление сопутствующего заболевания или утяжеление его течения.

При проведении клинических исследований регистрации подлежат все неблагоприятные состояния пациента, несмотря на то, что они не имеют прямой связи с приемом исследуемого препарата.

Редко встречающиеся реакции на препарат можно выявить, проанализировав данные о состоянии здоровья большого числа пациентов, принимавших ИЛП.

Информацию о нежелательном явлении необходимо внести в форму регистрации нежелательных явлений либо в виде описания отдельных симптомов или синдромов (например, «повышение температуры», «головная боль», «повышенная утомляемость»), либо в виде диагноза (например, ОРВИ, грипп и т.п.).

К серьезным нежелательным явлениям относятся:

- а) смерть;
- б) состояние, угрожающее жизни;
- в) состояние, требующее госпитализации или продолжения текущей госпитализации;
- г) состояние, приводящее к стойкой или значительной утрате трудоспособности (дееспособности);
- д) появление дефекта развития;
- е) другое значимое, с медицинской точки зрения, событие.

До включения добровольцев в клиническое исследование врач-исследователь должен тщательно обследовать пациента и внести в его первичные медицинские документы и индивидуальную регистрационную карту сведения об имеющихся сопутствующих заболеваниях с указанием их тяжести.

Основными источниками сведений о нежелательных явлениях являются:

- выявление их при физикальном обследовании добровольца при визитах к исследователю;
- данные лабораторных и инструментальных исследований;
- расспрос добровольца о его самочувствии в период между визитами.

Информация о нежелательных явлениях, не относящихся к серьезным, переносится из первичной документации в индивидуальные регистрационные карты пациента (ИРК). Обычно ИРК содержат отдельные формы для регистрации сведений о нежелательных явлениях. Внесенные в них данные по нежелательным явлениям обрабатываются по завершении исследования вместе с остальной информацией, содержащейся в ИРК. В процессе обработки нежелательные явления перечисляются, классифицируются по тяжести проявления, а также по органам и системам; оценивается частота их возникновения. Результаты такого анализа являются основой для оценки безопасности исследуемого препарата.

Помимо регистрации серьезного нежелательного явления в ИРК, исследователь должен сообщить о нем руководителю медицинской организации или исследовательского центра, а также в Федеральный орган исполнительной власти, выдавший разрешение на проведение клинических испытаний как можно скорее.

Нельзя продолжать введение препарата пациентам, у которых наступило серьезное нежелательное явление (СНЯ), вне зависимости от того, связано ли оно с приемом препарата или нет. Решение о продолжении вакцинации или ее отмене может быть принято только после консультации и письменного согласия медицинских мониторов. Спонсор обязан представлять на рассмотрение уполномоченным органам (ЭСО/НЭК) все данные и периодические экспресс-отчеты по безопасности исследуемого продукта в соответствии с нормативными требованиями.

Существует список поствакцинальных реакций, рекомендуемый ВОЗ для сообщения в соответствующие инстанции (таблица).

Таблица

*Перечень поствакцинальных реакций*

Время после вакцинации	Поствакцинальные реакции
24 часа после вакцинации	Острая реакция гиперчувствительности Анафилактический шок Постоянный плач (дети раннего возраста) Эпизоды гипотензии-гипореактивности Токсический шок
5 дней после вакцинации	Тяжелые местные реакции Сепсис Абсцесс в месте инъекции (бактериальный или стерильный)
15 дней после вакцинации	Судороги, в том числе на фоне высокой температуры (6-12 дней в случае вакцины против кори/MMR, 0-2 дня в случае DTP)
3 месяца после вакцинации	Острый вялый паралич (4-30 дней после вакцинации OPV, 4-75 дней для контактных лиц) Воспаление плечевого сплетения (2-28 дней после вакцинации, содержащей столбнячный анатоксин) Тромбоцитопения (15-35 дней после вакцинации против кори/ MMR)
1-12 месяцев после вакцинации БЦЖ	Лимфаденит, генерализованная инфекция БЦЖ, остеоит и остеомиелит
Без временных пределов	Случаи смерти, госпитализация и другие серьезные или необычные явления, которые медицинские специалисты связывают с вакцинацией

### 4.3. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

При проведении клинических исследований следует обратить особое внимание на противопоказания к введению ИЛП, которые определяются в доклинических и в I фазе клинических исследований. При этом используются материалы, полученные в результате ранее зарегистрированных препаратов. При планировании клинических исследований должны быть четко обоснованы критерии включения и исключения добровольцев с учетом возможных противопоказаний, связанных с составом ИЛП и результатами изучения безопасности отдельных его компонентов.

При формировании групп добровольцев, принимающих участие в исследовании по изучению безопасности и эффективности профилактических препаратов, привлекаются практически здоровые лица, не имеющие противопоказаний. Кроме того, противопоказаниями являются лишь немногие виды патологии, повышающие риск развития поствакцинальных осложнений.

Перечень противопоказаний к введению ИЛП определяется Министерством здравоохранения и социального развития РФ и приводится в Национальном календаре прививок и в других официальных материалах. Строгое соблюдение перечня противопоказаний способствует снижению необоснованных медицинских отводов от профилактических прививок. Необоснованные медицинские отводы от прививок приводят к тому, что дети с соматической патологией, аллергическими и неврологическими заболеваниями оказываются беззащитными перед инфекционными болезнями, которые у них протекают особенно тяжело.

Использование для массовой иммунизации современных высокоэффективных, малореактогенных вакцин привело к резкому сокращению частоты тяжелых реакций и осложнений, возникающих в поствакцинальном периоде.

Перечень медицинских противопоказаний к проведению профилактических прививок разработан с учетом рекомендаций ВОЗ и в настоящее время существенно сокращен.

Все противопоказания к иммунизации подразделяются на постоянные (абсолютные) и временные (относительные).

В свою очередь, постоянные противопоказания принято условно разделять на общие, относящиеся ко всем препаратам, и специфические, которые зависят от вида иммунобиологического препарата.

**Общие постоянные противопоказания включают:**

- первичный иммунодефицит (подтвержденный лабораторно);
- ВИЧ-инфекцию;
- злокачественные новообразования;
- злокачественные заболевания крови;
- неврологическую патологию тяжелой степени;
- сильные поствакцинальные реакции – общие (температура тела более 38,5 °С) или местные (гиперемия и/или отек в месте введения препарата диаметром более 5 см);
- сильные поствакцинальные осложнения на предыдущее введение медицинского иммунобиологического препарата;
- аллергические заболевания в тяжелой форме (анафилактический шок, отек Квинке, полиморфная эксудативная эритема, сывороточная болезнь и др.).

Перечень противопоказаний должен дифференцироваться в зависимости от вакцинного препарата. В этой связи следует выделять специфические противопоказания.

**Специфические постоянные противопоказания к применению отдельных препаратов:**

1. К применению АКДС-вакцины:
  - 1.1. Заболевания нервной системы с прогрессирующим течением:
    - родовая травма с кровоизлияниями в мозг и под его оболочки;
    - недоношенность с угнетением функций центральной нервной системы;
    - внутриутробное инфицирование;
    - наследственно-дегенеративные заболевания прогрессирующего характера;
    - врожденные опухоли головного и спинного мозга;
    - первичные вирусные и кокковые энцефалиты;
    - менингококковые энцефалиты, гнойные и серозные менингиты;
    - судорожный синдром, не поддающийся коррекции.
  - 1.2. Системные прогрессирующие заболевания.
  - 1.3. Сывороточная болезнь.
2. К применению живой полиомиелитной вакцины: кроме указанных общих противопоказаний, необходимо учитывать неврологические нарушения на предыдущую полиомиелитную прививку.
3. К применению живой коревой вакцины: тяжелые аллергические реакции на аминокгликозиды, перепелиные яйца или яичный белок (что в малых количествах присутствует в вакцине).
4. К применению живой паротитной вакцины: тяжелые аллергические реакции на аминокгликозиды, перепелиные яйца или яичный белок (содержатся в очень незначительных количествах в вакцине), а также тяжелая поствакцинальная реакция на коревую вакцину (анафилактический шок, отек Квинке, тяжелые энцефалитические реакции).
5. К введению краснушной вакцины: тяжелые формы аллергических реакций на аминокгликозиды, которые присутствуют в составе вакцины.
6. К введению вакцины против вирусного гепатита В: аллергические реакции на пекарские дрожжи (используются при производстве вакцины).
7. К введению БЦЖ-вакцины: келоидный рубец.

Все постоянные противопоказания – как общие, так и специфические, должны быть подтверждены на заседании иммунологической комиссии. Данная комиссия организуется с участием руководителя лечебно-профилактического учреждения (поликлиники, отделения), участковых медицинских работников (врач общей практики, педиатр), аллерголога-иммунолога, а также специалиста узкого профиля (в зависимости от характера заболевания). Результаты заседания комиссии оформляются письменным заключением, которое должно быть отмечено в амбулаторной карте, истории развития ребенка, карте профилактических прививок, журнале учета постоянных противопоказаний.

Временные медицинские противопоказания включают заболевания или нарушения состояния здоровья без тяжелых органических нарушений, которые заканчиваются выздоровлением, к ним относятся:

- острые заболевания различной этиологии, протекающие без осложнений – прививают через 4 недели после выздоровления; при легких формах заболеваний – через 2 недели после выздоровления, при нормальной температуре тела – через 1 неделю; при благоприятном течении заболевания (ОРВИ, ОКИ) профилактические прививки можно проводить сразу после нормализации температуры тела;
- хронические заболевания – прививают по достижении стойкой ремиссии (не менее 4 недель), при этом проводится курс реабилитационной терапии. Стабильные проявления аллергических заболеваний (локализованные кожные проявления) не являются противопоказанием к вакцинации, которая может быть проведена также на фоне соответствующей терапии;
- недоношенность (вес менее 2 кг) – прививают при нормальном физиологическом и психомоторном развитии; отставание в весе, по сравнению с доношенными сверстниками, не является противопоказанием к проведению прививок;
- прорезывание зубов у детей, сопровождающееся нарушением функции кишечника, повышением температуры тела, является противопоказанием от профилактических прививок на 1,5-2 недели. После исчезновения указанных симптомов проводится иммунизация;
- лечение гормональными препаратами в высоких дозах и получение массивной дозы лучевой терапии является противопоказанием для введения живых вакцин в течение 3-12 месяцев (в зависимости от состояния здоровья человека). Применение стероидной терапии в небольших дозах (1-1,5 мг/кг в сутки в течение 2 недель) не является противопоказанием к назначению прививок;
- прибывшие из зоны повышенной радиации – проводится медицинский осмотр, в том числе и на предмет оценки состояния щитовидной железы (при необходимости назначают УЗИ щитовидной железы), общий анализ крови и мочи, иммунологические исследования; при отсутствии каких-либо нарушений можно назначить прививку;
- длительно текущие тяжелые заболевания (вирусные гепатиты В, С, туберкулез, хронический полиартрит, хронические заболевания почек и др.) – прививают живыми вакцинами через 6-12 месяцев после наступившей ремиссии, а анатоксины (АДС, АДС-М) вводят в возможно ближайший срок, определяемый состоянием здоровья, а также результатами лабораторных исследований;
- иммунодефицитные состояния, в том числе ВИЧ-инфицирование – эти лица могут быть привиты анатоксинами (АДС, АДС-М и др.) под контролем результатов иммунологических исследований;
- после введения иммуноглобулинов человека, плазмы и других препаратов крови прививки проводят через 3-6 месяцев. После лечения иммуносупрессивными препаратами иммунизация проводится через 6 месяцев.

Все лица, имеющие временные противопоказания, прививаются по индивидуально составленному графику иммунизации, который предусматривает соответствующую подготовку перед проведением прививки, а также профилактический курс медикаментозной терапии в поствакцинальном периоде. Все временные противопоказания подлежат ре-

гистрации в медицинской документации (амбулаторная карта, история развития ребенка, карта профилактических прививок). При длительном течении заболевания – более 3-6 месяцев – вопрос об иммунизации решается на иммунологической комиссии.

Естественно, что при включении в клинические исследования добровольцев, необходимо проводить тщательное их клинико-лабораторное обследование с учетом выявления противопоказаний.

#### 4.4. ИММУНОГЕННОСТЬ

Одним из критериев оценки качества вакцинных препаратов является определение их иммунологической активности, т.е. способности вызывать выработку специфических антител.

Показатели иммунологической активности вакцин при ряде инфекционных заболеваний (таких как дифтерия, столбняк, корь, гепатит В и др.) отражают их защитные потенции. Для отдельных нозологических форм инфекционных болезней установлены защитные титры, т.е. минимальное содержание в крови антител, обеспечивающих защиту от инфекции. При определении уровней антител, большое значение имеет метод их детекции, а также качество используемой тест-системы. Так, например, при гриппе защитным титром считается уровень специфических антител 1:40 при определении их в реакции торможения гемагглютинации. Защитным титром при кори считается уровень специфических антител 1:40, определяемый в реакции пассивной гемагглютинации, и 1:4 – в реакции торможения гемагглютинации; при краснухе 1:20 в реакции торможения гемагглютинации; при полиомиелите 1:32 в реакции нейтрализации. При отдельных инфекциях защитные титры выражаются в международных единицах. При гепатите В защитным считается уровень антител более 10 мМЕ/л, определяемый в иммуноферментных тест-системах. Однако, при ряде инфекционных заболеваний иммунологические показатели не отражают защитных свойств препарата (например, при дизентерии). В этих случаях наиболее объективным показателем является определение профилактической эффективности вакцины. Следует также отметить, что методика серологической оценки иммунологической эффективности не применима к вакцинам против ряда инфекций (бруцеллез, туляремия, туберкулез), в патогенезе которых ведущая роль принадлежит клеточному иммунитету, поэтому иммунологическая эффективность соответствующих вакцин может оцениваться по проявлению клеточного иммунитета или путем постановки кожно-аллергических проб.

Для большинства инфекций, в патогенезе которых ведущее значение принадлежит клеточному иммунитету, индивидуальные «защитные» уровни клеточных реакций имеют лишь относительное значение.

Изучение иммунологической эффективности новых вакцин проводится путем сопоставления титров специфических антител в сыворотках крови, привитых до и в разные сроки после иммунизации, а также путем сравнения этих данных с результатами определения уровня антител у лиц, получивших в те же сроки препарат сравнения. Препаратом сравнения может служить однонаправленный препарат отечественного или зарубежного производства с известными показателями профилактической и (или) иммунологической активности, разрешенный к практическому применению в России. Показатели иммунологической активности вновь разработанных вакцин, как и другие показатели их качества, оцениваются при проведении различных фаз клинических испытаний.

Наиболее объективную оценку иммунологической эффективности вакцины получают при вакцинации людей, не имеющих специфических антител. Для этой цели перед вакцинацией проводится предварительное тестирование на наличие специфических антител сывороток крови людей, включенных в исследование, а затем методом случайной выборки из лиц, не имеющих антител (т.н. серонегативных), формируют основную и контрольные группы. Лиц, вошедших в состав основной группы, вакцинируют испытые-

мым препаратом, а лица контрольной группы получают препарат сравнения (референс-препарат) или плацебо.

Основными показателями, характеризующими иммунологическую эффективность, являются: сероконверсия, серопротекция и уровень специфических антител.

*Показатель серопротекции (ПС)* исчисляется в процентах, по соотношению числа привитых с защитными титрами и выше, к общему числу обследованных, отдельно по результатам исследования сывороток лиц, вошедших в состав основной и контрольной групп, по формуле:

$$\% \text{ПС} = \frac{\text{кол-во лиц с защитными титрами и выше}}{(\text{общее число обследованных})} \times 100$$

Средний уровень специфических антител определяется по значениям их среднегеометрических титров антител.

Иммунологическая эффективность вакцин, предназначенных для профилактики широко распространенных инфекций (например, грипп и другие воздушно-капельные инфекции), оценивается, как правило, без предварительного скринингового обследования добровольцев, т.к. трудно подобрать контингенты, не имеющие антител к этим инфекциям. В данном случае иммунологическая эффективность оценивается по нарастанию титров антител в сыворотках, взятых до и после вакцинации как в опытной, так и в контрольной группах. При этом отдельно анализируются результаты вакцинации в группах лиц, исходно серонегативных и, имеющих различные уровни антител.

Одним из важных условий при изучении показателей иммуногенности являются оптимальные (в зависимости от инфекций) сроки взятия крови у испытуемых лиц.

Как правило, при однократной иммунизации помимо «фоновой крови» второе взятие крови проводится через 28-45 дней после прививок (в зависимости от вида инфекции, для профилактики которой предназначена испытуемая вакцина). При двух- и трехкратной схеме иммунизации кровь в наблюдаемых группах рекомендуется брать через 21-28 дней после завершения полного курса иммунизации.

Для достоверной оценки иммунологической эффективности вакцин большое значение имеет численность наблюдаемого контингента, которая зависит от назначения препарата и схемы его введения.

При однократной иммунизации количество наблюдаемых лиц должно быть не менее 100 человек, а при двух- и трехкратном введении вакцины численность контингента должна составлять не менее 150 человек, так как в процессе исследования из-за продолжительности периода вакцинации возможно «выпадение» из наблюдения некоторого числа участников. Для оценки иммунологической эффективности кровь у обследуемого может забираться из вены или из пальца с последующим получением сыворотки (или плазмы). Количество получаемой крови зависит от особенностей диагностической тест-системы и вида иммунологической реакции.

Образцы сывороток крови до тестирования должны храниться в замороженном состоянии. При их тестировании необходимо соблюдать одно из основных правил строго контролируемых испытаний – одновременная постановка всех проб крови от одного человека. С целью объективной оценки полученных данных сыворотки крови перед постановкой должны шифроваться. Тестируемые образцы перед исследованием формируют в блоки, состоящие из одинакового количества сывороток, взятых до и после иммунизации от лиц, вошедших в основную и контрольную группы. Для исключения погрешностей при постановке серологических реакций, все сыворотки, полученные от одного человека, должны входить в один блок. Определение уровня специфических антител осуществляют с помощью тест-систем, зарегистрированных для практического применения.

Целесообразно осуществлять постмаркетинговые исследования, направленные на оценку иммунологической эффективности вновь зарегистрированных вакцин. Постмаркетинговые серологические исследования могут осуществляться Центрами Госсанэпид-



надзора в субъектах Российской Федерации или проводятся по специальному заданию Минздравсоцразвития России.

Иммунологические исследования в условиях практического здравоохранения проводятся в системе эпидемиологического надзора в следующих целях:

- определения фактической защищенности различных групп населения против той или иной инфекции;
- определения иммуногенности используемой дозы вакцины для вакцинации различных возрастных групп;
- изучения профилактической эффективности вакцины;
- оценки состояния поствакцинального иммунитета в различные сроки после вакцинации у лиц, привитых против какой-либо инфекции;
- в случае повышенной заболеваемости среди привитых отдельными сериями вакцины.

В связи с широким распространением инфекций, передающихся парентеральным путем, взятие крови для проведения иммунологических исследований представляет определенную эпидемиологическую опасность. Поэтому эти исследования должны быть четко обоснованы и осуществляться с разрешения главных врачей территориальных центров санэпиднадзора. Взятие крови, особенно у детей, является одной из причин негативного отношения родителей к вакцинации, ведущего к снижению охвата населения профилактическими прививками.

Как уже отмечено выше, результаты иммунологических исследований во многом зависят от качества диагностических систем и стандартности условий постановки серологических реакций. Использование тест-систем с низкой чувствительностью и специфичностью может привести к получению т.н. ложных результатов и, в связи с этим, к принятию неадекватных решений.

В настоящее время в ряде регионов страны складывается неблагоприятная экологическая обстановка, которая может оказывать негативное воздействие на иммунную систему человека и, соответственно, на эффективность вакцинации. С целью изучения возможного неблагоприятного воздействия окружающей среды на иммуногенность той или иной вакцины целесообразно в рамках IV фазы клинических испытаний проводить сравнительную оценку иммуногенности вакцин как на территориях, находящихся в зонах «загрязнения», так и на «чистых» территориях, т.е. осуществлять многоцентровые клинические испытания.

Сопоставление результатов иммунологических показателей у привитых на сравняемых территориях позволит объективно оценить влияние воздействия факторов внешней среды на интенсивность иммунного ответа. При планировании подобного рода исследований, следует соблюдать принципы контролируемых исследований:

- одинаковые по возрасту и полу группы привитых;
- одна и та же серия вакцины;
- единые сроки взятия крови у привитых;
- постановка сывороток в одной лаборатории с использованием идентичных тест-систем.

#### **4.5. ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ**

Одним из основных и наиболее объективных показателей, характеризующих эффективность вакцин, является оценка их профилактической эффективности, т.е. определение количественных параметров защиты от заболеваний той инфекцией, для профилактики которой предназначен препарат.

Профилактическая эффективность вакцин оценивается по двум основным показателям: коэффициенту эффективности и (или) индексу эффективности. При этом первый показатель характеризует процент лиц из числа привитых, защиту которых обеспечивает вакцина; второй показатель отражает соотношение заболеваемости в группе привитых и не привитых,

что указывает, во сколько раз заболеваемость среди привитых ниже таковой, чем среди лиц не получавших вакцину.

Оценка профилактической эффективности как на стадии их разработки и внедрения в практику здравоохранения (III фаза клинических испытаний), так и на постмаркетинговом уровне (IV фаза) проводится в установленном регламентирующими документами порядке.

Определение показателей профилактической эффективности вакцин проводится в условиях специально организованных полевых контролируемых эпидемиологических опытов, для чего формируется основная и контрольная группы.

При этом такие исследования предпочтительно проводить на территориях с наиболее высоким уровнем заболеваемости той инфекцией, для профилактики которой предназначен препарат.

Основная группа привитых препаратом и контрольная группа, получающая плацебо (в качестве плацебо обычно используется «наполнитель» вакцины без активного его компонента), должны формироваться из контингентов повышенного риска заболевания, представлять равноценные по всем критериям группы одних и тех же коллективов и находиться под наблюдением в одно и то же время.

В ряде случаев при оценке профилактической эффективности препарата целесообразно, исходя из этических соображений, использовать вместо плацебо вакцины, предназначенные для профилактики других инфекционных заболеваний. При этом схема иммунизации, дозировка и место введения препарата, предназначенного для вакцинации лиц, вошедших в состав контрольной группы, должны быть идентичными испытываемой вакцине. Естественно, что при выборе препарата, используемого вместо плацебо, необходимо учитывать эпидемиологическую целесообразность его применения на территориях, избранных для оценки профилактической эффективности вакцины.

В условиях контролируемого эпидемиологического опыта суммируются материалы наблюдения среди различных коллективов, территорий, характеризующихся различным уровнем заболеваемости, поэтому необходимо соблюдать численное равенство наблюдаемых групп, а также их идентичность по половым, возрастным и др. характеристикам.

Равноценность основной и контрольной групп достигается при одинаковой методике их отбора с помощью случайно-выборочного метода. При формировании основной и контрольной групп особое значение имеет показатель, характеризующий единицу выборки. Чаще за единицу выборки принимается один человек, т.е. в одном и том же коллективе один человек получает вакцину, другой – плацебо. Однако в отдельных случаях за единицу выборки можно принимать группу лиц, находящихся в одних и тех же условиях, например, группу в детских дошкольных учреждениях, класс в школах и т.д. Групповая выборка возможна при условии одинаковой интенсивности распространения инфекции в тех или иных коллективах. Следует иметь в виду, что при вакцинации «через одного» (единица выборки – один человек) в наблюдаемом коллективе создается иммунная прослойка, равная 50%. Это, естественно, влияет на интенсивность распространения инфекции в контрольной группе. В связи с этим искусственно занижаются показатели профилактической эффективности изучаемой вакцины.

С этой целью при определении единицы выборки необходимо учитывать особенность инфекции с учетом путей передачи, интенсивности проявления ее в различных коллективах, а также возможность реализации путей передачи не только в одном коллективе (например, в классе школы), но и в целом ряде коллективов или отдельно взятых учреждениях. Естественно, что при широко распространенных инфекциях, особенно характеризующихся воздушно-капельным механизмом передачи, единица выборки может быть более крупной (класс, школа, детское дошкольное учреждение и т.п.).

Одним из необходимых условий, которое должно соблюдаться при организации контролируемых исследований, является шифрование испытываемого препарата и плацебо. При этом медицинский персонал, который осуществляет вакцинацию и в дальнейшем проводит лабораторно-клинические обследования, а также проводит сбор и

анализ заболеваемости, не должен знать, какой препарат получили те или иные контингенты.

Расшифровка всех материалов проводится только по окончании наблюдения и составления заключения по его результатам. Шифрование препаратов и других материалов, в частности, сывороток крови, осуществляется специальной комиссией, состоящей из специалистов, не заинтересованных в результатах исследования. Шифры хранятся в запечатанных конвертах, члены комиссии принимают участие в расшифровке материалов.

Для получения статистически достоверных данных о показателях профилактической эффективности вакцины численный состав группы привитых и получающих placebo (соответственно основная и контрольная группа) определяется после проведения многолетнего ретроспективного анализа заболеваемости инфекцией, для профилактики которой предназначен препарат. При этом для получения статистически достоверных результатов необходимо исходить из минимально ожидаемой заболеваемости среди контингентов, включенных в испытание.

Численный состав групп наблюдения ( $W$ ) определяется по следующей формуле:

$$W = \frac{n3,84k(1 + k)1000}{m(1 - k)^2},$$

где  $n$  – число наблюдаемых групп;  $m$  – ожидаемая минимальная заболеваемость (на 1000) населения;  $k$  – предполагаемый минимальный индекс эффективности, который может быть принят как существенный для данной вакцины, т.е. во сколько раз предполагаемая заболеваемость среди привитых будет ниже, чем среди не привитых.

Профилактическая эффективность оценивается путем сравнения показателей заболеваемости в группе привитых испытуемым препаратом с таковыми среди лиц, получивших placebo. Как видно из представленной формулы, величина контингентов, включаемых в контролируемые исследования, зависит от заболеваемости и предполагаемого индекса эффективности вакцины. При этом, чем выше эти показатели, тем меньше численный состав групп, необходимый для получения статистически достоверной разницы между заболеваемостью в основной и контрольной группах.

При этом сроки наблюдения обычно выбираются с учетом времени сезонного подъема данного заболевания и, как правило, должны быть не менее 10 месяцев.

Оценка профилактической эффективности, проводится путем расчета следующих показателей индекса эффективности (ИЭ), который рассчитывается по следующей формуле:

$$\text{ИЭ} = \frac{\text{показатель заболеваемости на 1000, получивших placebo}}{\text{показатель заболеваемости на 1000, привитых испытуемым препаратом}},$$

и коэффициента эффективности (КЭ):

$$\text{КЭ} = \frac{(\text{показатель заболеваемости среди получивших placebo}) - (\text{показатель заболеваемости среди привитых препаратом})}{\text{показатель заболеваемости среди получивших placebo}} \times 100,$$

Индекс эффективности менее нагляден, чем коэффициент, и менее удобен для сопоставления эффективности нескольких препаратов. Поэтому, при сравнении эффективности однонаправленных вакцин, лучше пользоваться коэффициентом эффективности.

Особое место в проведении исследований по оценке профилактической эффективности вакцин занимает качественный и полный сбор данных о числе случаев заболеваний в основной и контрольной группах. При этом необходимо учитывать все случаи заболеваний, независимо от их клинического проявления.

В связи с этим, проведение исследований по оценке профилактической активности препарата предполагает организацию качественной диагностики, что позволяет наиболее полно выявлять больных, в том числе стертыми и иннапарантными формами заболева-

ния, в обеих группах наблюдения. Например, при оценке профилактической эффективности гриппозных вакцин у больных с клиническим диагнозом грипп или ОРЗ требуется определение этиологического фактора. Для этого, по мере обращения заболевших, независимо от тяжести заболевания, проводится исследование парных сывороток, при этом диагноз гриппа подтверждается 4-кратным и более нарастанием титров специфических антител.

Таким образом, для оценки показателей профилактической эффективности гриппозных вакцин необходимо, прежде всего, учитывать данные серологической диагностики, т.е. удельный вес гриппа, как в контрольной, так и в основной группах наблюдения.

#### **4.6. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ**

Одной из задач постмаркетинговых исследований вновь зарегистрированного препарата является разработка оптимальной тактики его применения в практике здравоохранения, т.е. определения его эпидемиологической эффективности в условиях массовой иммунизации населения. Эта работа проводится для оценки влияния вакцинации на заболеваемость в конкретной эпидемиологической обстановке.

Эффективность вновь зарегистрированных вакцинных препаратов при массовой иммунизации зависит от ряда причин, одной из которых является показатель профилактической эффективности препарата, т.е. потенциальные защитные свойства вакцины (индекс или коэффициент эффективности), охарактеризованные на этапах ее внедрения.

Однако применение вакцин, обладающих даже высокой защитой, не всегда сопровождается заметным эпидемиологическим эффектом. В связи с этим одним из важных факторов, влияющих на эпидемиологическую эффективность вакцинации, является правильно избранная тактика применения препаратов в практике здравоохранения. Естественно, что тактика вакцинопрофилактики базируется, прежде всего, на эпидемиологических особенностях проявления той или иной инфекции на конкретных территориях. При этом важное значение имеет выбор контингентов, подлежащих иммунизации, сроки проведения вакцинации, эпидемиологически обоснованный выбор территорий, процент охвата вакцинацией лиц из группы высокого риска заражения и строгое соблюдение схем иммунизации. Кроме того, необходимо учитывать условия транспортировки и хранения препаратов, а также отношение населения к вакцинации.

В связи с этим одной из основных задач эпидемиологического надзора при оценке эффективности вакцинопрофилактики является установление причин, оказывающих негативное воздействие на реализацию защитных потенциалов вакцин, с целью их устранения. Исходя из выше изложенного, при планировании исследований по оценке эффективности вакцинопрофилактики необходимо предусматривать перечень мер, позволяющих осуществить сбор качественной информации необходимой для проведения подобного рода исследований.

При этом прежде всего следует организовать полный учет и регистрацию заболеваний не только среди привитых, но и тех, кто по каким-либо причинам не был вакцинирован.

Определяющее значение имеет тщательный сбор данных обо всех случаях заболеваний той инфекцией, для профилактики которой предназначен препарат. При этом, естественно, следует особое внимание уделять анализу случаев заболевания среди привитых. Необходимо собрать информацию о заболеваемости по следующим вопросам:

- сроки проведения вакцинации, серия и срок годности вводимого препарата;
- выдержана ли полная схема вакцинации;
- место проведения иммунизации, условия хранения и доставки препарата;
- данные эпидемиологического обследования очага инфекционного заболевания,

что позволит установить причины заболевания у привитых и оценить возможность реализации защитных свойств вакцины при массовом ее применении.

Оценка эффективности массовой иммунизации может проводиться с использованием следующих методов:

- сопоставление заболеваемости в группах привитых и не привитых в определенных возрастных когортах и профессиональных группах в одни и те же сроки наблюдения на одних и тех же территориях;
- проведение ретроспективного эпидемиологического анализа заболеваемости до и после введения вакцинного препарата;
- проведение эпидемиологического анализа заболеваемости на различных территориях: территории, на которой иммунизация проводилась и не проводилась, при условии одинакового уровня заболеваемости на этих территориях на протяжении нескольких предыдущих лет.

При анализе этих данных следует учитывать, что по характеру воздействия массовых прививок на эпидемический процесс все инфекционные заболевания можно разделить на две группы:

- заболевания, при которых эффективность вакцинации связана с непосредственной защитой от инфицирования лишь тех, кто был иммунизирован; это относится прежде всего к природно-очаговым инфекциям, например, клещевому энцефалиту;
- заболевания, при которых вакцинация населения приводит к снижению заболеваемости как вследствие непосредственной защиты от заболевания привитых, так и в результате уменьшения вероятности заболевания не иммунных лиц, за счет созданной иммунной прослойки при конкретном инфекционном заболевании.

При организации работ по оценке эпидемиологической эффективности вакцинопрофилактики необходимо обратить особое внимание на качество диагностики, используя методы, позволяющие максимально выявлять не только клинически выраженные случаи заболевания, но легкие и стертые формы инфекции.

Мероприятия по оценке эпидемиологической эффективности вновь внедренных вакцин при применении их в практике здравоохранения в постмаркетинговый период наблюдения нуждаются в специальном планировании. Для получения достоверной информации, связанной как с изучением возможных осложнений при массовом использовании препарата, так и его эффективности, работы по постмаркетинговым наблюдениям следует организовывать и проводить на определенных территориях по специально разработанной программе.

#### **4.7. ЛЕЧЕБНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ**

Иммунобиологические лекарственные препараты применяются, как для профилактики, так и для лечения целого ряда инфекционных и неинфекционных заболеваний. Лечение с применением ИЛП следует рассматривать как иммунотерапию, которая проводится при нарушениях механизмов иммунитета, а также при недостаточной эффективности антибактериальной терапии и частым формированием лекарственной устойчивости у возбудителей. Иммунотерапия с помощью ИЛП стимулирует иммунную систему, усиливает специфические и неспецифические факторы иммунитета, способные подавлять размножение микроорганизмов, нейтрализовать и элиминировать токсические продукты.

Иммунотерапевтический метод применяется в настоящее время в различных областях медицины (хирургия, терапия, онкология, гематология, нефрология, дерматология, трансплантология, иммунология) для лечения следующих заболеваний и состояний:

- инфекционных и паразитарных;
- онкологических и лимфопролиферативных;
- неврологических;
- аутоиммунных и аллергических;

- врожденной и приобретенной иммунологической недостаточности;
- кризов отторжения пересаженных органов и тканей.

Основным показанием для назначения лечебных ИЛП является клинический диагноз заболевания, по которому определяются схема и курс лечения соответствующим препаратом.

При инфекционной патологии иммунотерапия используется в случаях острой и хронической инфекции, бактерионосительства и персистенции вирусов, аллергии и аутоиммунных заболеваний инфекционного происхождения. Кроме того, иммунотерапевтическое воздействие эффективно при травмах, оперативных вмешательствах и других видах патологии, которые привели или могут привести к инфекционным осложнениям, а также при внутрибольничном инфицировании.

В арсенале средств специфической и неспецифической стимуляции иммунной системы имеется большое количество ИЛП, которые по своему действию на организм человека разделяются на активные и пассивные, специфические и неспецифические.

Для активной специфической иммунотерапии в клинической практике используют лечебные вакцины, онковакцины, аллергены, лечебные препараты из микробных лизатов и другие препараты, содержащие в своем составе специфические антигены.

Активная неспецифическая иммунотерапия осуществляется путем введения микробных иммуностимуляторов, иммуномодуляторов, интерфероногенов, индукторов цитокинов, пробиотиков и других препаратов.

С целью пассивной специфической иммунотерапии применяют иммуноглобулины (нормальные и специфические), иммунные сыворотки, моноклональные антитела. Получили применение и препараты для пассивной неспецифической иммунотерапии – цитокины, иммунокомпетентные клетки, неспецифические иммуноглобулины, которые в отличие от препаратов активного иммунотерапевтического действия применяются преимущественно в острую фазу заболевания по экстренным показаниям.

Кроме того, все ИЛП иммуностропного действия могут быть классифицированы на эндогенные (естественные), приготовленные из субстанций, присущих самому организму (антитела, цитокины и др.) и экзогенные, полученные из животного, микробного, растительного или синтетического материала (вакцины, гетерологичные сыворотки, иммуномодуляторы и пр.).

Для лечения заболеваний могут быть использованы одновременно разные средства специфического и неспецифического воздействия на иммунную систему, а также возможны различные способы и варианты их применения.

Следует выделить большую группу лечебных ИЛП, которые успешно зарекомендовали себя в практическом здравоохранении – это сывороточные препараты и моноклональные антитела. Нормальные и специфические иммуноглобулины, сыворотки, плазма крови и моноклональные антитела являются мощным средством экстренной профилактики и лечения многих заболеваний, прежде всего инфекционных.

Сывороточные препараты применяются для профилактики и лечения вирусных и бактериальных инфекций, для лечения первичных и вторичных иммунодефицитов, аутоиммунных, аллергических, дерматологических заболеваний, для подавления реакции отторжения пересаженных органов и тканей и являются ценным средством для стимулирования собственного иммунитета организма.

Все сывороточные препараты принято разделять на гомологичные, полученные из крови человека (донорские и плацентарные), и гетерологичные, полученные из крови животных (лошадей и др.).

Сыворотки и иммуноглобулины применяются, главным образом, по экстренным показаниям, т.к. они создают непродолжительный пассивный иммунитет. Так, после введения гомологичного иммуноглобулина иммунитет сохраняется 4-5 недель, при этом сильные побочные реакции, как правило, не регистрируются. Гетерологичные сывороточные препараты имеют ряд недостатков: продолжительность циркуляции спец-

и физических антител в организме человека не более 2 недель, возможны случаи сильных аллергических реакций, во избежание которых перед введением необходимо обязательное тестирование посредством кожной пробы. В настоящее время с целью снижения реактогенности сывороточных препаратов применяют иммуноглобулины для перорального введения, например, комплексные иммуноглобулины плазмы (КИП) для лечения кишечных инфекций.

Успешно зарекомендовала себя группа ИЛП, в которую входят лечебные вакцины и препараты для специфической иммунотерапии. Действие данных препаратов направлено на стимуляцию иммунной системы, что дает возможность применять их при бактерио- и вирусоносительстве в случаях безуспешной антибиотикотерапии. Лечебные моновакцины усиливают не только специфический иммунитет, но и стимулируют неспецифические факторы иммунитета, что особо важно при длительном скрытом течении инфекционного заболевания. С этой целью в медицинской практике используется большой перечень лечебных вакцин: живые (бруцеллезная, БЦЖ), инактивированные (герпетическая, гонококковая), вакцины из условно-патогенных микроорганизмов (ВП-4, протейная, стафилококковые, препараты из живых бактерий нормофлоры (пробиотики), лечебные комплексные препараты из лизатов микроорганизмов (бронхомунал, ИРС 19, имудон, рибомунил и др.), вакцины для профилактики онкозаболеваний (Гардасил, Церварикс, Имурон) и другие препараты, содержащие различные фракции и антигены микробов (пирогенал, продигиозан, стафилококковый анатоксин, антифагин и т.п.).

С целью специфической диагностики и лечения аллергических заболеваний применяется большая группа препаратов – аллергены, аллергоиды и аллерговакцины. Аллергенами, в первую очередь, являются чужеродные белки и сложные комплексы, содержащие белки, липиды, мукополисахариды животного или растительного происхождения, а также соединения небелковой природы.

В природе существует огромное множество аллергенов, которые классифицируются по ряду признаков. Наиболее широко распространена классификация, основанная на происхождении аллергенов. Согласно данной классификации все аллергены разделяются на эндоаллергены и экзоаллергены. Аллергены, поступающие в организм из внешней среды, называются экзоаллергенами. Эндоаллергены или аутоаллергены представляют собой видоизмененные белки, образующиеся в самом организме вследствие различных причин.

Экзоаллергены проникают в организм человека различными путями: респираторным, алиментарным, парентеральным, через кожу и слизистые оболочки. К экзогенным инфекционным аллергенам относятся возбудители (и продукты их жизнедеятельности) различных инфекционных и паразитарных заболеваний.

Эндоаллергены, в свою очередь, подразделяются на естественные (аллергены физиологически изолированных органов при нарушении их биологического барьера) и приобретенные в результате влияния на организм различных повреждающих факторов внешней среды (инфекционных, термических, химических и др.).

Аллергенные свойства веществ зависят от их структуры, дозы, пути проникновения в организм, наследственной предрасположенности и состояния физиологических систем организма.

В зависимости от типа аллергии, причин и условий ее возникновения, лечебные аллергены могут быть:

Инфекционные:

- препараты бактериальных аллергенов;
- препараты для диагностики инфекционных заболеваний;
- препараты грибковых аллергенов.

Неинфекционные:

- пылевые;
- аллергоиды;

- бытовые;
- эпидермальные;
- пищевые;
- лекарственные;
- химические и др.

Применяемые в практике лечебные бактериальные аллергены получают из условно-патогенной флоры и патогенных возбудителей инфекционных заболеваний, таких как стафилококк, стрептококк, кишечная палочка, протей и др.

Бактериальные аллергены в основном являются диагностическими (туберкулезный очищенный и рекомбинантный, бруцеллезный, сибиреязвенный, туляремийный). Другие аллергены используются для специфической иммунотерапии больных с различными хроническими инфекционно-аллергическими заболеваниями (бронхо-легочные, желудочно-кишечные, ЛОР и др.).

Грибковые аллергены чаще применяются с диагностической целью для выявления чувствительности к соответствующим видам плесневых или дрожжеподобных грибов у больных с инфекционно-аллергическими заболеваниями.

Лечебные неинфекционные аллергены используются зачастую для иммунотерапии пыльцевой аллергии на цветение растений и содержат в своем составе пыльцевые аэро-аллергены и аллергоиды.

Лечебные препараты к бытовым аллергенам (пыли, перу, насекомым и бытовой химии) могут применяться как с целью лечения, так и с целью диагностики заболевания. В то же время, пищевые, эпидермальные и лекарственные аллергены являются исключительно диагностическими.

Учитывая, что основным методом лечения аллергических болезней является специфическая иммунотерапия (СИТ), способ введения препаратов имеет существенное значение. В силу того, что подкожное введение аллергена в нарастающих дозах имеет ряд недостатков, в настоящее время ведутся разработки новых способов иммунотерапии аллергических заболеваний, которые более безопасны и менее реактогенны (пероральный, сублингвальный и т.п.).

Многочисленную группу препаратов для неспецифической иммунотерапии представляют пробиотики, иммуностимуляторы микробного происхождения, препараты интерферонов и цитокинов, эндогенные иммунорегуляторные пептиды, синтетические иммуностимуляторы. Данные препараты оказывают иммунокорректирующее действие на организм в целом, стимулируя местный, общий и врожденный иммунитет, что крайне необходимо для успешного лечения хронических инфекционно-аллергических заболеваний.

Все вышеперечисленные группы иммунобиологических препаратов применяются в медицинской практике для лечения, диагностики и профилактики различных заболеваний и поэтому должны проходить тщательный отбор по показателям клинической и профилактической эффективности, безопасности, безвредности на всех фазах клинических исследований.

Крайне важно, чтобы каждый препарат, обладающий иммунотропным действием, прошел контролируемые испытания при конкретных видах патологии, указанных в инструкции по его применению. Для выбора наиболее безопасных и эффективных препаратов следует проводить исследования по сравнительному изучению с однонаправленными препаратами, уже зарегистрированными в стране, оптимально подбирая дозы и схемы, методы и способы введения ИЛП.

Показатели эффективности иммунотерапии определяются по результатам клинических испытаний ИЛП, проводимых на различных фазах исследования препарата и характеризуются:

- улучшением клинической картины болезни;
- нормализацией клинико-лабораторных показателей крови, мочи и др.;



- сокращением длительности заболевания и числа его рецидивов;
- снижением дозы и длительности этиотропного лечения;
- инактивацией и элиминацией патогенных микроорганизмов;
- предотвращением формирования хронических форм заболевания и снижением летальности;
- стимулированием иммунной системы организма.

Процесс разработки и изучения лечебного и профилактического действия ИЛП включает в себя последовательное проведение четырех фаз клинических исследований. При испытании препарата может потребоваться несколько этапов исследования в рамках одной и той же фазы. Если препарат успешно проходит испытания в первых трех фазах, он получает регистрационное удостоверение. Исследования IV фазы являются пострегистрационными исследованиями.

В исследованиях I фазы обычно участвуют от 20 до 100 здоровых добровольцев. Исследования этой фазы проводятся в специализированных учреждениях, где есть необходимое оборудование и специально обученный персонал. Исследования I фазы могут быть открытыми, а также рандомизированными и слепыми. Целью исследований I фазы является определение переносимости препарата, его реактогенности, а иногда и предварительной оценки безопасности.

На основании этих данных осуществляется выбор дозы, схемы вакцинации и метод введения препарата. Необходимо проведение лабораторных исследований (биохимические исследования крови, мочи и т.п.) для получения основных базовых данных по безопасности. Фаза I клинических исследований может быть проведена с участием различных возрастных или популяционных групп. Результаты, полученные в I фазе исследований, используются при планировании следующей фазы клинических исследований.

Исследования фазы II проходят с участием большей популяции волонтеров (100 и более добровольцев). Основная цель этих исследований – определить уровень дозирования и схему приема препарата, а также оценить его лечебную эффективность. В фазе II обязательно наличие контрольной группы, которая по составу и количеству пациентов не отличается от группы, получающей изучаемый препарат. Пациенты в двух группах должны быть сопоставимы по полу, возрасту, тяжести течения заболевания и предшествующему фоновому лечению. При этом эффективность и переносимость нового препарата сравнивают либо с плацебо, либо с другим лечебным препаратом, который является, так называемым, «золотым стандартом» в лечении данного заболевания.

Исследования III фазы – это рандомизированные контролируемые мультицентровые клинические исследования с участием большой популяции пациентов (300-3000 чел.). Эти исследования спланированы таким образом, чтобы подтвердить предварительно оцененные в ходе II фазы безопасность и эффективность препарата, а также выбранные наиболее оптимальные дозировки и схемы применения препарата. В исследованиях III фазы также может изучаться зависимость эффекта от дозы препарата. Рекомендация к широкому клиническому применению нового препарата считается обоснованной при соблюдении следующих условий:

- препарат более эффективен, чем известные препараты аналогичного действия;
- обладает лучшей переносимостью в сравнении с уже известными препаратами;
- эффективен в тех случаях, когда лечение уже известными препаратами безуспешно;
- экономически более выгоден;
- прост в применении;
- имеет более удобную лекарственную форму;
- обладает синергичным действием при комбинированной терапии, не повышая токсичности.

Фаза IV клинических испытаний (пострегистрационные исследования) проводится после регистрации препарата и необходима для дальнейшей оптимизации его применения.

Важной задачей фазы IV является сбор дополнительной информации по безопасности препарата на достаточно больших группах людей в течение длительного времени его применения.

В ходе проведения IV фазы исследований обобщаются также данные по оценке таких параметров, как сроки лечения, взаимодействие с другими препаратами, сравнительный анализ стандартных курсов лечения, эффективность применения у больных различных возрастных групп, экономические показатели лечения и отдаленные результаты лечения.

#### **4.8. ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ**

Особое значение при проведении пострегистрационных клинических исследований ИЛП занимают исследования, направленные на изучение вопросов, связанных с экономической эффективностью избранной тактики вакцинопрофилактики. При этом информация об экономической оправданности применения препарата представляет на сегодняшний день особую актуальность.

Оценка экономической эффективности вакцинопрофилактики осуществляется по результатам специально организованных клинических исследований, в задачи которых входят:

- установление эффективности вакцинации путем сравнения показателей заболеваемости в группах привитых и не привитых;
- определение затрат, связанных с заболеванием среди привитых и не привитых, а также затрат на проведение иммунизации;
- расчета экономической эффективности вакцинопрофилактики.

Особое внимание при оценке экономической эффективности должно быть обращено на достоверную клиническую диагностику заболевания с использованием клинико-лабораторных методов исследования.

Кроме того, важное значение имеет сравнительная оценка клинического течения заболевания у привитых и не привитых участников исследования (по тяжести и длительности заболевания, частоте осложнений). Эти данные также следует использовать при расчете экономических затрат.

В зависимости от источников финансирования экономические затраты включают в себя: производственные потери, оплату больничного листа, прямые медицинские расходы (медицинское обслуживание и покупку пациентом лекарств).

При расчете производственных потерь учитывается длительность отсутствия больного на рабочем месте и снижение его работоспособности до 60% при выходе на работу во время болезни. Также учитывается система оплаты по больничному листу (за счет медицинского страхования и особенностей оплаты на производстве).

Определение экономического эффекта проводится с учетом экономических затрат в зависимости от прививочного анамнеза больных, при этом отдельно определяются затраты в группах привитых и не привитых.

При расчете экономической эффективности вакцинопрофилактики определяют разницу между ожидаемыми и фактическими экономическими затратами (ЭЗ).

При этом ожидаемые ЭЗ высчитываются исходя из затрат, которые могли быть в коллективах, при условии отсутствия в них вакцинопрофилактики, исходя из показателей заболеваемости в данном коллективе за последние 5 лет.

Фактические ЭЗ определяют на основании экономических затрат, связанных с фактической заболеваемостью привитых и не привитых в тех же коллективах, при условии проведения в них вакцинопрофилактики. Фактические ЭЗ определяются по результатам показателя иммунной прослойки.

Экономический эффект (ЭФ) равен разнице между ожидаемыми и фактическими ЭЗ за вычетом затрат на проведение прививок (ЗПП).

Таким образом,  $ЭФ = (\text{ожидаемые ЭЗ} - \text{фактические ЭЗ}) - ЗПП$ .

Описанная методика расчета экономической эффективности вакцинопрофилактики может служить основой для расчета экономической рентабельности вакцинопрофилактики при различных уровнях заболеваемости.

Определенный интерес представляет определение экономических затрат в расчете на одного человека, в случае возникновения заболевания в группах с различной производственной квалификацией.

Оценка экономической эффективности вакцинопрофилактики проводится в IV фазе клинического исследования.



## **РАЗДЕЛ II**

### **ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП ИЛИ**



## ГЛАВА 5

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАКЦИН (ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ)

*СОСТАВИТЕЛИ: д. м. н., проф. М.А. Горбунов, д. м. н., проф. Н.Ф. Никитюк, к. м. н. Г.А. Ельшина, к. м. н. В.Н. Икоев, к. м. н. Н.И. Лонская, к. б. н. К.М. Мефед, М.В. Соловьева, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравоуразвития России, Центр экспертизы и контроля ИЛП*

#### 5.1. ВИДЫ ВАКЦИН И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

Вакцины – это препараты, получаемые из живых аттенуированных штаммов или убитых культур микроорганизмов и их антигенов, предназначенные для создания активного иммунного ответа в организме привитых людей и животных.

Среди различных групп медицинских биологических препаратов, применяемых для иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней, вакцины являются наиболее эффективным средством предупреждения инфекционных заболеваний. Основным действующим началом каждой вакцины является иммуноген, по структуре аналогичный компонентам возбудителя заболевания, ответственным за выработку иммунитета.

В зависимости от природы иммуногена вакцины подразделяются на:

- живые;
- убитые (инактивированные);
- расщепленные (сплит-вакцины);
- субъединичные (химические) вакцины;
- анатоксины;
- рекомбинантные;
- конъюгированные;
- виросомальные;
- вакцины с искусственным адъювантом;
- комбинированные (ассоциированные поливакцины).

##### **Живые вакцины**

Живые вакцины содержат ослабленные живые микроорганизмы (бактерии, вирусы, риккетсии), созданные на основе апатогенных возбудителей, аттенуированных в искусственных или естественных условиях, путем инактивации генов или за счет их мутаций. Живые вакцины создают устойчивый и длительный иммунитет, по напряженности приближающийся к постинфекционному иммунитету, при этом для выработки иммунитета, как правило, достаточно однократного введения препарата. Вакцинный инфекционный процесс продолжается несколько недель, не сопровождается клинической картиной заболевания и приводит к формированию специфического иммунитета.

##### **Убитые (инактивированные) вакцины**

Убитые вакцины готовятся из инактивированных вирулентных штаммов бактерий и вирусов и содержат убитый целый микроорганизм, или компоненты клеточной стенки и

других частей возбудителя, обладающих полным набором необходимых антигенов. Для инактивации возбудителей применяют физические (температура, радиация, УФ-лучи) или химические (спирт, ацетон, формальдегид) методы, которые обеспечивают минимальное повреждение структуры антигенов. Эти вакцины обладают более низкой иммунологической эффективностью, по сравнению с живыми вакцинами, поэтому вакцинация проводится, в основном, в 2 или 3 приема и требует ревакцинации, что формирует достаточно стойкий иммунитет, предохраняя привитых от заболевания или уменьшая его тяжесть.

### **Расщепленные (сплит-вакцины)**

Вакцины содержат разрушенные инаktivированные вирионы, при этом сохраняя все белки вируса (поверхностные и внутренние). За счет высокой очистки от вирусных липидов и белков куриного эмбриона, субстрата культивирования сплит-вакцины имеют низкую реактогенность. Высокая степень специфической безопасности и достаточная иммуногенность позволяют их применение среди детей с 6-месячного возраста и беременных женщин.

### **Субъединичные (химические) вакцины**

Субъединичные вакцины состоят из отдельных антигенов микроорганизма, способных обеспечить надежный иммунный ответ у привитого. Для получения протективных антигенов преимущественно используются различные химические методы с последующей очисткой полученного материала от балластных веществ. Применение адъювантов усиливает эффективность вакцин. Субъединичные (химические) вакцины обладают слабой реактогенностью, могут вводиться в больших дозах и многократно, а также применяться в различных ассоциациях, направленных одновременно против ряда инфекций.

### **Анатоксины**

Анатоксины готовятся из микробных экзотоксинов, утративших токсичность в результате обезвреживания формальдегидом при нагревании, но сохранивших видовые антигенные свойства и способность вызывать образование антител (антитоксинов). Очищенный от балластных веществ и концентрированный анатоксин сорбируют на гидроксиде алюминия. Анатоксины формируют антитоксический иммунитет, который слабее постинфекционного иммунитета.

### **Рекомбинантные вакцины (векторные)**

Рекомбинантные вакцины получают клонированием генов, обеспечивающих синтез необходимых антигенов, введением этих генов в вектор и в клетки-продуценты (вирусы, бактерии, грибы и пр.), затем культивируют клетки *in vitro*, отделяют антиген и очищают его. Новая технология открыла широкие перспективы в создании вакцин. Рекомбинантные вакцины безопасны, достаточно эффективны, для их получения применяется высокоэффективная технология, они могут быть использованы для разработки комплексных вакцин, создающих иммунитет одновременно против нескольких инфекций.

### **Конъюгированные вакцины**

Вакцины представляют собой конъюгаты полисахарида, полученного из возбудителей инфекции и белкового носителя (дифтерийного или столбнячного анатоксина). Полисахариды-антигены обладают слабой иммуногенностью и слабой способностью к формированию иммунологической памяти. Связывание полисахаридов с белковым носителем, хорошо распознаваемым иммунной системой, резко усиливает иммуногенные свойства конъюгата и вызывает протективный иммунитет.



### **Виросомальные вакцины**

Виросомальные вакцины содержат инактивированный виросомальный комплекс, ассоциированный с высокоочищенными протективными антигенами. Вирсомы выполняют функции носителя антигена и адьюванта, усиливая иммунный ответ, способный индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет.

### **Вакцины с искусственным адьювантом**

Принцип создания таких вакцин заключается в использовании естественных антигенов возбудителей инфекционных заболеваний и синтетических носителей. Один из вариантов таких вакцин состоит из белкового антигена вируса и искусственного стимулятора (например, полиоксидония), обладающего выраженными адьювантными (повышающими иммуногенность антигенов) свойствами.

### **Комбинированные вакцины (ассоциированные поливакцины)**

Данные вакцины представляют собой смесь штаммов разных видов возбудителей или их антигенов для профилактики двух и более инфекций. При разработке комбинированных вакцин учитывается совместимость не только антигенных компонентов, но и их различных добавок (адьювантов, консервантов, стабилизаторов и пр.). Это вакцины различных типов, содержащие несколько компонентов. Побочные реакции организма на ассоциированные вакцины возникают, как правило, несколько чаще, чем на моновакцины, но позволяют создавать защиту привитых в сжатые сроки от нескольких инфекционных болезней.

Актуальной задачей современной вакцинологии является постоянное совершенствование вакцинных препаратов, подходов к их применению, отработок схем, дозировок, методов и сроков введения среди различных возрастных групп.

Особенности технологии производства вакцины, а также механизм их действия при формировании иммунитета необходимо учитывать при организации и проведении всех этапов клинических испытаний.

До начала проведения клинических исследований, следует четко обосновать выбор территорий и контингентов для проведения планируемых исследований. С этой целью необходимо проведение ретроспективного эпидемиологического анализа инфекционного заболевания на определенной территории среди популяции, включаемой в протокол клинических испытаний. По результатам эпидемиологического анализа отбирают группы добровольцев по возрасту, полу, социальным характеристикам, в том числе территориальным и сезонным колебаниям заболеваемости, что крайне необходимо при планировании клинических испытаний и определения безопасности и эффективности различного вида вакцин.

## **5.2. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАКЦИН**

**Основными задачами клинических исследований** при регистрации новых вакцин являются:

- оценка безопасности;
- количественная оценка и характер местных и общих реакций на введение вакцин;
- оценка иммунологической эффективности;
- оценка профилактической эффективности.

Отбор контингентов для участия в клиническом испытании осуществляется в соответствии с критериями по включению, которые указываются в Протоколе. Особое внимание обращается на лиц из групп риска, которые подвергаются тщательному лабораторному обследованию. Количество лиц, участвующих в клиническом испы-

тании, так же как и время, затраченное на испытания, определяются, исходя из характера препарата, схемы его введения, сбора и оценки материалов по эффективности и безопасности. Все клинические исследования должны придерживаться стандартов, описанных в GCP.

#### **Клинические исследования вакцин проводятся при:**

- внедрении в практику вновь разработанных вакцин;
- регистрации зарубежных вакцин;
- изменении возрастных дозировок вакцин;
- изменении схем иммунизации;
- изменении технологии изготовления препарата.

При испытании вакцин необходимо учитывать следующие факторы:

- вакцины предназначены для вакцинации различных возрастных групп населения;
- вакцины предотвращают заболевание, однако при этом следует анализировать ожидаемую пользу к возможному риску применения препарата;
- вакцины являются биопрепаратами, которые требуют специальных методов определения эффективности и безопасности.

Серии вакцин перед проведением различных фаз клинических испытаний, должны подвергаться лабораторной экспертизе качества с последующим документальным оформлением результатов контроля.

Кроме того, в соответствии с рекомендациями ВОЗ регуляторные органы страны должны осуществлять инспекцию исследовательских центров или клинических баз до начала проведения клинических испытаний, во время их проведения, а также оценивать результаты, полученные после проведения испытаний. Целью инспекции является проверка правильности выполнения заявителем всех процедур испытаний в соответствии с правилами GCP. При освоении производства вновь разработанных вакцин, регуляторные органы проводят также инспекцию производства препарата на соответствие требованиям GMP.

#### **Методология клинических исследований вакцин**

Методологические подходы, относящиеся к различным фазам клинических испытаний оценки вакцин, должны быть детально проработаны во время стадии подготовки и планирования клинических испытаний. Все применяемые методы требуют четкого описания.

До начала проведения исследований определяются методики исследований вакцин, которые документируются в Протоколе клинических испытаний. Они обычно включают в себя определение показателей безопасности и эффективности препаратов на всех стадиях клинических исследований. Кроме того, необходима валидация всех методов лабораторных исследований, применяемых для адекватной оценки эффективности и безопасности вакцин. Если диагностика заболеваний основывается на определенных клинико-лабораторных критериях, необходимо провести валидацию данных критериев. Для определения иммунологической эффективности используются наиболее чувствительные и специфичные лабораторные методы исследования по определению показателей гуморального или клеточного иммунитета.

Исследование вакцин проводится поэтапно в соответствии с целями клинических испытаний.

При этом важно отметить, что I этап клинических исследований обычно проводится на здоровых добровольцах, не имеющих противопоказаний к введению вакцины. Основную группу добровольцев следует подбирать с учетом критериев включения и исключения, описанных в Протоколе клинических исследований. Если вакцина предназначена для применения детям, она может исследоваться на ограниченной группе детей только после проведения в полном объеме испытаний на здоровых взрослых.

### **Критерии включения и исключения добровольцев в клиническое исследование**

Для каждой фазы испытаний должны быть определены строгие критерии включения и исключения. Добровольцы, включенные в испытания, должны быть соответствующей возрастной группы, в зависимости от задач исследования. При этом должно быть документальное врачебное подтверждение о надлежащем состоянии здоровья добровольцев, при испытании вакцины на детях необходимо согласие на участие детей их родителей или опекунов.

Добровольцы не должны быть включены в исследования, если они имеют противопоказания к введению той или иной вакцины. В испытания не включаются добровольцы, страдающие различными хроническими заболеваниями органов и систем, прогрессирующими неврологическими расстройствами, злокачественными новообразованиями, иммунодефицитными состояниями и т.п. При решении вопроса о включении субъекта в исследования, принимается во внимание состояние его иммунного статуса (иммунодефицит, иммуносупрессия и/или недоношенность). Другими критериями о недопустимости к участию в исследовании могут стать социальные, этнические особенности и другие причины. Следует так же принимать во внимание то, что после первого или второго приемов вакцины могут последовать серьезные нежелательные явления неврологического, токсического или аллергического характера и такие лица должны исключаться из дальнейшего наблюдения.

### **Безопасность и реактогенность вакцины**

Безопасность и реактогенность вакцины являются главными критериями оценки качества вакцинных препаратов. В результате проведенных клинических исследований особое внимание обращается на возникшие побочные эффекты, которые тщательным образом должны быть описаны в соответствующих документах.

Информация по изучению безопасности и реактогенности вакцины подробно изложена в главе 4 данного Руководства.

**Иммуногенность** вакцины как критерий оценки качества препарата изучается на основании результатов проведения иммунологических методов исследования с последующим определением показателей напряженности иммунного ответа у исследуемых лиц (раздел I, глава 4 данного Руководства).

**Профилактическая эффективность** вакцинного препарата определяется на основании сопоставления показателей заболеваемости конкретной инфекцией в группе привитых изучаемой вакцины и в контрольной группе. Показатель профилактической эффективности характеризует защитные потенции вакцины, которые зависят от индивидуальной восприимчивости, резистентности организма к инфекционному агенту, а также от длительности специфического иммунитета, его напряженности и антигенной активности той или иной вакцины.

Показатель профилактической эффективности вакцины зависит от качества диагностики и полноты выявления случаев заболевания среди привитых и непривитых и определяется чувствительностью и специфичностью диагностических тест-систем, предназначенных для постановки диагноза заболевания.

При определении профилактической эффективности вакцин особое внимание следует уделять мерам, направленным на максимальное выявление случаев заболевания как в основной, так и в контрольной группах (раздел I, глава 4 Руководства).

Качество оценки профилактической эффективности вакцин зависит от следующих факторов:

- количественного и качественного формирования основной и контрольной групп с учетом показателей заболеваемости в них;
- единицы выборки (методика рандомизации);

- качества и полноты регистрации случаев заболеваний;
- качества диагностики (клиническая и лабораторная).

### **Мониторинг безопасности и отчет о побочных эффектах**

Неблагоприятными случаями в исследованиях вакцин являются любые побочные эффекты, регистрируемые у лиц, участвующих в исследовании. При этом необходимо установить наличие следственно-причинной связи между таким случаем и проведенной вакцинацией. Проведение мониторинга в поствакцинальном периоде позволяет своевременно выявить возможные побочные эффекты, связанные с введением вакцины.

Все отклонения от нормы должны быть описаны в отчетах о клинических испытаниях. При возникновении побочных эффектов, связанных с применением вакцины у детей раннего возраста, родителям необходимо связаться с исследователями. До того, как будет введена вторая и/или третья доза (если необходимо), родители ребенка или сами вакцинированные пациенты должны быть опрошены в отношении поствакцинальной реакции, возникшей после приема первой дозы. В свою очередь, исследователь должен контролировать поствакцинальный период каждого субъекта, участвующего в исследовании.

В некоторых случаях, при возникновении серьезных побочных эффектов, испытания могут быть приостановлены до выявления природы их возникновения. При этом мониторинг безопасности вакцины должен быть продолжен даже после прекращения или завершения испытаний.

### **Статистические методы исследования**

Статистический метод определения эффективности вакцин основан на результатах, полученных при проведении исследований методами рандомизации, двойным слепым методом, плацебо-контролируемым, с установлением соответствующего доверительного интервала (обычно 95%).

Если в клинических испытаниях используется препарат-сравнения (ранее зарегистрированная вакцина), определение показателей эффективности и безопасности новой вакцины основываются на сравнительной оценке этих показателей с вакциной, уже прошедшей лицензирование с указанием методов статистической обработки, позволяющих достоверно оценить сравниваемые показатели.

### **Количество опытных образцов, необходимых для проведения клинических испытаний**

В протоколе должны быть четко указаны расчеты по количеству опытных образцов вакцины, необходимых для достижения поставленной цели исследования (иммуногенность, безопасность и эффективность), при этом необходимо указать точное количество задействованных в испытании добровольцев. Количество образцов испытуемой вакцины и препарата сравнения рассчитывается, исходя из выбранных целей, а также схем введения препаратов.

### **Длительность проведения клинических испытаний**

Сроки проведения исследований, главным образом, зависят от поставленных задач и схем вакцинации. Как правило, для всех видов вакцин необходимы долгосрочные исследования, связанные с выбором оптимальных дозировок препарата по показателям безопасности и эффективности. Продолжительность исследования определяется в соответствии с составленным Протоколом клинических исследований, в котором указываются сроки вакцинации и проведения серологических, иммунологических исследований, а также период наблюдения за отдаленными последствиями вакцинации, длящимися не менее 6 месяцев после завершения полного курса вакцинации.

## Этапы клинических исследований вакцин

### *1 этап (фаза)*

Данные по оценке иммуногенности или эффективности вакцин, проведенные на соответствующих экспериментальных животных, должны быть представлены и проанализированы до начала реализации программы клинических испытаний. В случае отсутствия подходящих лабораторных моделей следует рассматривать данные доклинических испытаний, полученные в ходе проведения альтернативных исследований *in vitro* в целях создания адекватной программы клинических исследований.

В ходе проведения I фазы клинических исследований определяются показатели безопасности и реактогенности, а также, если возможно, предварительные данные по иммуногенности вакцины. На основании этих параметров осуществляется подбор дозы и способа введения вакцины. В основном, I фаза клинических исследований направлена на изучение переносимости и безопасности препарата на ограниченном контингенте здоровых волонтеров.

I фазу клинических испытаний необходимо проводить на базе исследовательских центров, оснащенных надлежащим лабораторным оборудованием. Фаза I клинических исследований представляет собой, как правило, открытое не плацебо-контролируемое рандомизированное исследование. Однако, может возникнуть необходимость в проведении контролируемых клинических исследований с использованием плацебо. Использование контрольной группы позволяет выявить возникновение нежелательных явлений, не связанных с введением вакцин (например, вспышки ОРЗ, ОРВИ и т.п.). По возможности, следует избегать одновременного применения добровольцами других вакцин или лекарственных средств, что необходимо для наиболее точной оценки показателей безопасности изучаемой вакцины. Фаза I клинических исследований может быть проведена с участием различных возрастных или популяционных групп. До проведения вакцинации целесообразно проведение лабораторных исследований (например, клинического анализа крови или функциональной пробы печени) для получения основных базовых данных в отношении добровольцев, включенных в исследование. Для осуществления тщательного мониторинга за добровольцами рекомендуется кратковременное пребывание в центре проведения клинических исследований или многократные наблюдения в условиях клиники, стационара дневного пребывания или амбулаторно. Возможны также ежедневные визиты медицинского персонала по месту жительства добровольца или ежедневное посещение волонтером медицинского учреждения.

Применение живых аттенуированных вакцин (вирусных или бактериальных) может повлечь развитие клинических проявлений инфекции у волонтера, так и у контактирующих с ним лиц. Основное внимание при оценке живых аттенуированных вакцин необходимо обращать на возможность выделения штамма и передачу его лицам, контактирующим с волонтером. При этом возможна генетическая изменчивость и возврат к вирулентным формам. Исходя из этого, при клиническом изучении таких вакцин необходимы дополнительные исследования и тщательный мониторинг в условиях медицинского учреждения. Исследование кандидатного штамма в составе живых аттенуированных вакцин должно быть проведено в целях предварительного подбора дозы, изучения иммунного ответа, клинических признаков инфекции и показателей реактогенности (немедленного типа, ранних или отдаленных). Во время проведения I фазы исследований могут быть получены предварительные данные по выделению возбудителя вакцинного штамма вируса, реверсии вирулентных свойств штамма, генетической стабильности, передаче его лицам, контактирующим с волонтером.

Показатели, определенные в I фазе исследований, используются при планировании последующих фаз клинических исследований.

### *II этап (фаза)*

После получения удовлетворительных результатов по итогам проведения I фазы исследований приступают к реализации фазы II клинических исследований вакцины-кандидата. Основным отличием между I и II фазой исследований является проведение фазы II на расширенном контингенте с участием большего количества добровольцев, формированием основных и контрольных групп с использованием метода рандомизации, т.е. проведение контролируемых исследований.

Основной задачей II фазы является проведение исследований, направленных на определение иммуногенности соответствующего активного компонента(ов) и безопасности вакцины-кандидата в выбранной группе добровольцев. По завершении II фазы должны быть определены оптимальная доза, предварительная схема вакцинации и показатели безопасности вакцины-кандидата.

Исследования, проводимые во II фазе, должны быть направлены на оценку показателей состояния иммунной системы вакцинируемого, таких как возраст, этническая принадлежность, пол, наличие материнских и фоновых антител. К другим факторам, которые необходимо исследовать для определения иммунного ответа относятся: доза вакцины, кратность или интервал между введением вакцин, схема иммунизации, способ введения вакцины.

Численность добровольцев, включаемых во II фазу клинических исследований, определяется задачами предстоящих исследований и необходимостью получения статистически достоверных материалов.

Учитывая, что на этой фазе клинических исследований определяются оптимальные дозы и схемы иммунизации и при необходимости дальнейшей оценки их эффективности при вакцинации различных возвратных групп, численность добровольцев должна составлять от 100 до 600 и более человек.

Продолжительность (напряженность) иммунитета и предполагаемая потребность в бустерной дозе и качественная оценка иммунного ответа также являются предметом исследования при проведении II фазы. Если невозможно оценить защитные потенции вакцины по показателям иммуногенности, т.е. не установлена корреляция между антигенной активностью и защитой от заболевания, одной из задач II фазы испытаний является определение оптимальной дозы препарата, для дальнейшего использования ее в ходе крупномасштабной III фазы испытаний изучения профилактической эффективности.

В связи с изложенным, изучение параметров иммунного ответа на введение антигена(ов), входящего в состав вакцины является наиболее важной частью II фазы клинических исследований. Вакцины, для которых иммунологические показатели, коррелирующие с защитой не известны, иммунологический профиль привитого должен быть изучен наиболее детально. При этом необходимо получить информацию, связанную с наличием нейтрализующих или перекрестных антител, образованием иммунных комплексов, проявлением факторов клеточного иммунитета, и других результатов исследования, оценивающих иммунную систему привитого.

Для изучения иммунного ответа сыворотки крови должны отбираться от всех участников исследования на регулярной основе, с заранее определенными интервалами, в течение всего периода исследований. Данные, полученные в ходе иммунологических исследований, должны включать средний геометрический титров антител, среднее и стандартное отклонение, а также уровень специфических антител в сыворотке крови до и после каждого введения вакцины. Вакцины, для которых установлен защитный титр антител (например, 10 МЕ/мл для антител к вирусу гепатита В), иммунологические данные соотношения титров антител до и после вакцинации являются показателем, характеризующим защиту. Любая используемая методика в ходе проведения II фазы исследований должна быть полностью документально подтверждена и валидирована.

### *III этап (фаза)*

III этап исследований представляет собой широкомасштабные клинические исследования, направленные на получение данных по эффективности и безопасности вакцины. Данные исследования обычно проводятся на больших группах волонтеров с целью оценки эффективности и безопасности иммунологически активного компонента(ов). В крупномасштабных исследованиях по оценке профилактической эффективности принимают участие до нескольких тысяч волонтеров, серологические данные обычно собираются, как минимум, от подгруппы вакцинированных пациентов по заранее определенной схеме.

Если уровень заболеваемости инфекцией, для которой предназначена изучаемая вакцина очень низок, проведение исследования профилактической эффективности может быть нецелесообразным или крайне затруднено. В таких случаях III фаза исследований, хотя и включает в себя большее количество волонтеров, чем предыдущие стадии, будет ограничиваться сравнительной оценкой иммунного ответа привитых и сравнения этих данных с уже установленными данными иммунологической эффективности препарата сравнения. Однако существуют ситуации, когда факторы иммунологической защиты не установлены, и важно предпринять попытки к установлению эффективности вакцины после ее регистрации в широкомасштабном применении препарата в практике здравоохранения (IV фаза). Учитывая, что III фаза исследований включает большее число волонтеров, чем предыдущие этапы исследований, обеспечивается и более полноценная оценка безопасности.

По результатам III фазы клинических испытаний, определяются характер и задачи пострегистрационных исследований.

Результаты, проведенных клинических исследований должны гарантировать, что вакцина является безопасной и фактически способна предотвратить развитие инфекционного заболевания или значительно уменьшить неблагоприятные последствия болезни.

### *Пострегистрационные исследования вакцин (IV этап)*

После регистрации вакцины проводится мониторинг ее эффективности и безопасности в условиях практического применения, т.е. IV фазы исследований. Эти исследования относятся к постмаркетинговому надзору или пострегистрационным испытаниям. Цель таких исследований состоит в мониторинге применения вакцины в условиях ее практического применения для определения нежелательных реакций и ее эффективности в рамках программ вакцинопрофилактики.

Для проведения пострегистрационных исследований составляются специальные протоколы, в которых определяются цели и задачи работы. Исследования IV фазы могут носить по своему дизайну как «открытый» характер, так и контролируемые испытания с использованием контрольной группы добровольцев.

Пострегистрационные исследования могут проводиться для определения следующих параметров применения той или иной вакцины:

- оптимального использования вакцины (например, расширения возраста привитых, сочетанного применения с введением других вакцин, изменений вакцинного штамма и т.п.);
- эффективности в отдельных группах риска (например, у лиц пожилого возраста, у лиц с иммунной недостаточностью и пациентов с верифицированными диагнозами);
- длительности эффективности;
- мониторинга безопасности.

Протокол пострегистрационного испытания вакцин должен разрабатываться с учетом особенностей эпидемиологии заболевания, его распространения на различных территориях, особенностях возрастной структуры и т.п.

Проведение пострегистрационных исследований (фаза IV) оправдано также для определения частоты и характеристики редко встречающихся и редко развивающихся осложнений, связанных с иммунизацией. В связи с этим одной из целей IV фазы исследования является определение и выявление редко встречающихся или непредвиденных явлений, которые могли быть не установлены в результате исследований

II или III фазы из-за ограниченного объема выборки привитых. Данные о безопасности вакцин осуществляются путем активного и пассивного сбора информации.

На практике часто используется и тот, и другой метод сбора информации. Наиболее часто используется добровольное сообщение о нежелательных явлениях (пассивный надзор). Данный тип надзора эффективен при определении серьезных и необычных побочных осложнений. Однако, при этом реальный уровень случаев нежелательных явлений в значительной мере занижается.

Направленные (целевые) исследования с целью определения частоты и характера нежелательных явлений позволяют получить более достоверные данные.

Вслед за определением профилактической эффективности в рандомизированных контролируемых клинических исследованиях IV фазы должна быть определена эффективность новой вакцины в условиях ее применения в практике здравоохранения. При исследовании эффективности иммунизации определяют прямую (иммунная прослойка) и косвенную (косвенную) защиту (например, защиту невакцинированных пациентов в вакцинированной популяции (популяционный иммунитет).

На эффективность вакцинации влияет ряд факторов, включая:

- охват популяции вакцинацией;
- иммунный статус популяции;
- корреляцию штаммов, использованных при производстве вакцины с циркулирующими штаммами микроорганизмов;
- частоту заболеваний, вызванных штаммами, не включенными в вакцину после вакцинации популяции.

Проводимый систематический в течение длительного периода пострегистрационный надзор, позволяет оценить эффективность вакцинации, а также разработать наиболее оптимальную тактику ее применения. Выполнение программы пострегистрационных испытаний может включать в себя комплекс серологических исследований для определения иммуноструктуры в определенной популяции в течение применения вакцинопрофилактики и сравнения этих показателей до ее проведения («исторические» данные). Эти исследования позволяют оценить программу иммунизации и при необходимости разработать новую более эффективную стратегию вакцинации.

В таблице приводятся цели, задачи и метод клинических исследований в соответствии с этапом их проведения.

Этапы	Цели испытания	Основные задачи	Метод
I	Переход к последующим фазам исследования	Безопасность Переносимость Иммуногенность	«Открытые» испытания
II	Регистрационные испытания	Определение оптимальных возрастных дозировок и схем иммунизации по показателям: реактогенности; безопасности; иммуногенности	Контролируемые испытания «слепой метод»
III	Регистрационные испытания	Определение иммунологической и/или профилактической эффективности; побочного действия; реактогенности	Контролируемые испытания «слепой метод»
IV	Пострегистрационные испытания	Эпидемиологическая эффективность (влияние на заболеваемость). Побочное действие (активный и пассивный сбор информации). Экономическая эффективность вакцинации. Сравнение эффективности однонаправленных препаратов. Расширение и/или уточнение показаний к применению	«Открытые» и/или контролируемые испытания



## **Выявление и регистрация серьезных нежелательных явлений при проведении клинических испытаний**

Серьезная нежелательная реакция представляет собой случай, связанный со смертью, госпитализацией, увеличением продолжительности госпитализации, постоянной нетрудоспособностью или риском для жизни в связи с клиническим испытанием. Все зафиксированные серьезные нежелательные реакции должны быть детально описаны с указанием следующей информации:

- исследовательский номер пациента или идентификационный номер;
- идентификация исследования;
- тип нежелательной реакции;
- временной интервал между вакцинацией и проявлением нежелательной реакции;
- характеристика пациента, включающая любое сопутствующее заболевание, дополнительную вакцинацию или прием лекарств;
- проведенные мероприятия, например, назначение лекарств;
- характер нежелательной реакции, включающий продолжительность, результат и оценку достоверности причинно-следственной связи.

Возможность биологической проверки на правдоподобие связи с вакцинацией должны быть рассмотрены и исследованы в каждом случае.

Активный контроль серьезных неблагоприятных явлений, зарегистрированных после иммунизации, имеет важное значение, т. к. такие реакции должны оцениваться по определенному стандарту с целью выявления причинно-следственной связи осложнения с вакцинацией.

Продолжительность мониторинга пациентов, участие которых в клиническом исследовании сопровождалось нежелательным явлением, зависит от специфики препарата. Такие формы должны использоваться, начиная с I фазы клинического исследования и далее.

Некоторые серьезные нежелательные явления, последовавшие за вакцинацией, могут быть слишком редкими и необычными для наблюдения в программах клинических исследований, предпринимаемых для регистрации препарата. Поэтому для получения более точного понимания соотношения риск-польза вакцины, необходимо осуществление программ пострегистрационного надзора.

### **Особенности клинических исследований комбинированных вакцин**

Комбинированная вакцина состоит из двух или более антигенов механически смешанных в составе одного препарата, предназначенном для предотвращения нескольких заболеваний или одного заболевания, вызываемого различными серотипами (или серогруппами) микроорганизма. Смешивание может происходить как на стадии производства, так и проводиться медицинскими работниками на месте перед введением вакцины – согласно инструкции по применению препаратов.

Основной целью клинических исследований комбинированных вакцин является оценка эффективности каждого антигенного компонента вакцины и безопасности комбинации, несмотря на то, состоит ли комбинация из уже зарегистрированных коммерческих вакцин или вновь разработанных компонентов. Иммуногенность и безопасность вновь разработанной комбинации должны сравниваться с эффектом введения моновакцин.

При условии того, что серологические показатели защиты были уже определены для каждого из антигенных компонентов, должна быть проведена оценка эффективности новой комбинированной вакцины, состоящей из уже лицензированных компонентов и/или компонентов с доказанной эффективностью, используя показатели иммуногенности для каждого компонента вакцин. В случае отсутствия данных о корреляции между показателями иммуногенности и защитой от заболевания требуются клинические исследования по определению защитных потенциалов вакцин.

Целью клинического исследования комбинированных вакцин является получение доказательств того, что эффективность предложенной комбинации антигенов не уступает ранее изученным показателям иммуногенности моновакцин. Задача таких исследований состоит в том, чтобы показать, что комбинация антигенов по показателям эффективности и безопасности сравнима с индивидуальными компонентами, входящими в препарат. Предполагается, что каждый из индивидуальных компонентов вносит существенный вклад в профилактический эффект вакцины.

Клинические исследования иммуногенности новых комбинированных вакцин для предотвращения нескольких заболеваний (мультивалентных комбинированных вакцин) должны быть спланированы таким образом, чтобы можно было получить достоверные данные иммунного ответа между новой вакциной и компонентами, вводимыми отдельно. В случае, если концентрация антител при введении комбинированной вакцины ниже, чем таковая при отдельном введении индивидуальных компонентов или одновременном введении индивидуальных вакцин, должны быть продолжены исследования по разработке оптимальных дозировок отдельных компонентов в комбинированных вакцинах.

Оценка безопасности комбинированных вакцин должна проводиться на всех этапах их клинических исследований. При этом безопасность комбинированных вакцин должна быть не выше или адекватной показателям безопасности индивидуальных компонентов или соответствующих монопрепаратов.

### Литература

1. Хлябич Г.Н., Сумароков А.А., Озерцовский Н.А., Ельшина Г.А., Гурвич Э.Б., Школьник Р.Я. Сравнительное изучение иммуногенности оспенных вакцин из штаммов Б-51, ЭМ-63 Л-ИВП в условиях контролируемого эпидемиологического опыта. ЖМЭИ, № 8, 1978, стр. 20-26.
2. Хлябич Г.Н., Сумароков А.А., Ельшина Г.А., Школьник Р.Я., Ярославская Н.В. Сравнительное изучение иммуногенности оспенных вакцин из штаммов Б-51, ЭМ-63 Л-ИВП в условиях контролируемого эпидемиологического опыта. ЖМЭИ, № 9, 1978, стр. 37-42..
3. Сумароков А.А., Хлябич Г.Н., Ельшина Г.А., Школьник Р.Я., Ярославская Н.В. Никитина В.А. К вопросу о методических принципах определения информативности лабораторных тестов оценки иммуногенности и реактогенности вакцин. ЖМЭИ, № 2, 1983, стр. 86-92.
4. Сумароков А.А., Ельшина Г.А., Драновская Е.А., Вершилова П.А., Шарипов М.К., Джабаров К.Д., Икоев В.Н., Харазян Э.Г. Сравнительное изучение безвредности, реактогенности и антигенной активности бруцеллезной химической и живой вакцин в условиях контролируемого эпидемиологического опыта. ЖМЭИ, № 2, 1984, стр. 58-63.
5. Икоев В.Н., Горбунов М.А. Изучение субъединичной плазменной вакцины против гепатита В в полевых испытаниях. ЖМЭИ, № 6, 1990, стр. 53-58 .
6. Икоев В.Н., Ананьев В.А., Горбунов М.А. Результаты полевых испытаний отечественной вакцины против гепатита В. Новости науки. Вирусология, том 22, 1990, Москва, стр. 49 .
7. Горбунов М.А., Павлова Л.И. Сравнительное изучение рекомбинантных вакцин против гепатита В в полевых условиях. Вопросы вирусологии, № 5, 1993, стр. 216-218 .
8. Горбунов М.А., Павлова Л.И. Оценка реактогенности и иммуногенности культуральной концентрированной инактивированной вакцины против гепатита А «Геп-А-ин-Вак». Вопросы вирусологии, № 5, 1995, стр. 219-221 .
9. Карпович Л.Г., Калашникова Т.В., Горбунов М.А. Сравнительное изучение иммуногенности инактивированной вакцины против гепатита А «Геп-А-ин-Вак» по данным экспериментальных и клинических исследований. Вопросы вирусологии, № 6, 1995, стр. 268-270 .
10. Павлова Л.И., Горбунов М.А. Отечественная рекомбинантная вакцина против гепатита В (Результаты контролируемых испытаний). Вопросы вирусологии, №4, 1996, стр. 170-172 .
11. Воробьева М.С., Ладыженская И.П., Расщепкина М.Н., Горбунов М.А. Сравнительное изучение инактивированных культуральных вакцин против клещевого энцефалита отечественного производства и производства фирмы «Иммуно», Австрия. Вопросы вирусологии, № 5, 1996, стр. 221-224 .

12. Горбунов М.А., Титов И.А. Результаты полевых клинических испытаний вакцины против гепатита В («Н-В-Вах»). Журнал клиническая фармакология и терапия, № 5, 1996, стр. 21-24.
13. Ельшина Г.А., Шерварли В.И., Горбунов М.А. Изучение гриппозной тривалентной полимер-субъединичной вакцины «Гриппол» в условиях контролируемого эпидемиологического опыта. Сообщение 1. Изучение реактогенности и безвредности вакцины «Гриппол». Военно-медицинский журнал, № 8, 1996, стр. 15 .
14. Ельшина Г.А., Шерварли В.И., Горбунов М.А. Оценка профилактической эффективности гриппозной тривалентной полимер-субъединичной вакцины «Гриппол». Военно-медицинский журнал, № 2, 1997, стр. 47-49.
15. Икоев В.Н., Горбунов М.А. Результаты контролируемых испытаний рекомбинантной живой вакцины против гепатита В. Вопросы вирусологии, № 3, 1997, стр. 135-137.
16. Перепелкин В.С., Сумароков А.А., Горбунов М.А. Сравнительная эффективность препаратов иммуноглобулина с различным содержанием специфических антител к вирусу возбудителя гепатита А. Военно-медицинский журнал, № 12, 1998, стр. 37-39.
17. Горбунов М.А., Павлова Л.И. Изучение отечественной культуральной концентрированной инактивированной вакцины против гепатита А «Геп-А-ин-Вак». ЖМЭИ, № 1, 1998, стр. 50-54.
18. Ельшина Г.А., Горбунов М.А., Шерварли В.И., Павлова Л.И. Оценка эффективности гриппозной тривалентной полимер-субъединичной вакцины «Гриппол». ЖМЭИ, № 3, 1998, стр. 40-43.
19. Горбунов М.А., Павлова Л.И. Результаты регистрационных клинических испытаний вакцины АКТ-ХИБ (производства фирмы «Пастер Мерье Коннот, Франция»). ЖМЭИ, № 2, 1999, стр. 45-48.
20. Горбунов М.А., Икоев В.Н. Оценка реактогенности и иммунологической активности новой концентрированной инактивированной лептоспирозной вакцины. ЖМЭИ, № 4, 1999, стр. 39-43.
21. Горбунов М.А., Икоев В.Н. Характеристика реактогенных и иммунологических свойств детского варианта вакцины против гепатита А «Геп-А-ин-Вак». Вопросы вирусологии, № 3, 1999, стр. 133-136 .
22. Павлова Л.И., Воробьева М.С., Горбунов М.А. Результаты полевых клинических испытаний вакцин против клещевого энцефалита. Актуальные проблемы медицинской вирусологии. Материалы конференции, Москва, 1999, стр. 38.
23. Бектимиров Т.А., Горбунов М.А., Шалунова Н.В., Павлова Л.И. Результаты регистрационных испытаний вакцины «Эувакс В» для профилактики гепатита В. Вакцинация, № 4, 1999, стр. 7.
24. Павлова Л.И., Горбунов М.А., Воробьева М.С. Изучение отечественной культуральной концентрированной инактивированной вакцины против клещевого энцефалита при вакцинации. ЖМЭИ, № 6, 1999, стр. 14-17.
25. Носкова А.В., Горбунов М.А., Павлова Л.И. Результаты оценки реактогенности, безвредности и иммуногенности инактивированной вакцины против гепатита А «Хаврикс» (производства фирмы Смит-Кляйн). Вопросы вирусологии, № 6, 2000, стр. 42-44.
26. Горбунов М.А., Павлова Л.И., Икоев В.Н. Принципы и система организации полевых испытаний эпидемиологической эффективности вакцин. Вакцинация, № 11, IX-X, 2000, стр. 6-7.
27. Бектимиров Т.А., Горбунов М.А., Никитюк Н.М. Принципы оценки иммунологической эффективности вакцин. БИО препараты, № 1, 2001, стр. 14-16 .
28. Икоев В.Н., Горбунов М.А., Ельшина Г.А. Результаты полевых клинических испытаний инактивированной вакцины против гепатита А «VAQTA». БИО препараты, № 2, 2001, стр. 18-21.
29. Горбунов М.А., Бектимиров Т.А., Икоев В.Н., Никитюк Н.М. Принципы оценки эпидемиологической эффективности вакцин и вакцинопрофилактики. БИО препараты, № 1, 2001, стр. 14-16.
30. Горбунов М.А., Бектимиров Т.А., Ельшина Г.А., Павлова Л.И. Характеристика вакцины против гепатита А «Авахім» производства фирмы Пастер Мерье (Результаты полевых клинических испытаний). Вопросы вирусологии, № 1, 2001, стр. 39-41 .
31. Ельшина Г.А., Бектимиров Т.А., Горбунов М.А. Результаты многоцентрового исследования по оценке реактогенности вакцины «Инфлювак» в условиях массовой иммунизации против гриппа. Эпидемиология и инфекционные болезни, № 3-4, 2002, стр. 51-55.

32. Горбунов М.А., Павлова Л.И., Воробьева М.С. Результаты полевых клинических испытаний новой концентрированной инактивированной вакцины против клещевого энцефалита «Энцеви́р». Эпидемиология и инфекционные болезни, № 5, 2002, стр. 57-60.
33. Рагимов А.А., Дашкова Н.Г., Горбунов М.А. Оценка эффективности схемы «экстренной» профилактики гепатита В. БИО препараты, № 1 (5), 2002, стр. 24-25.
34. Павлова Л.И., Горбунов М.А. Характеристика отечественной вакцины «Шигеллвак» против дизентерии Зонне. Био препараты. Профилактика, диагностика, лечение, № 1(5), 2002, стр. 5.
35. Павлова Л.И., Горбунов М.А., Ершов В.И. Результаты полевых клинических испытаний вакцины против гепатита В «Шанвак В». БИО препараты, № 2, 2003, стр. 10-12.
36. Попов В.Ф., Юнасова Т.Н., Горбунов М.А., Павлова Л.И. Результаты клинических испытаний по оценке вакцины против краснухи Республики Хорватии при регистрации в РФ. «Вакцинопрофилактика, иммунотерапия, иммунокоррекция» Тезисы, 2004, стр. 70-71.
37. Икоев В.Н., Горбунов М.А. Результаты полевых испытаний дивакцины против гепатитов А и В. БИО препараты, № 3 (15), 2004, стр.14-17.
38. Горбунов М.А., Медуницын Н.В. Организация и особенности проведения клинических испытаний иммунобиологических препаратов. Эпидемиология и Инфекционные болезни, № 5, 2005, стр. 20-23.
39. Чуприна Р.П., Павлова Л.И., Горбунов М.А., Апарин П.Г. Клинико-иммунологические исследования вакцины Вианвак на добровольцах. БИО препараты, № 4, 2005, стр. 12-15.
40. Гайдерова Л.А., Юнасова Т.Н., Попов В.Ф., Горбунов М.А. Пострегистрационная оценка индийской комбинированной вакцины против кори, паротита и краснухи. «Эпидемиология. Вакцинопрофилактика», № 6, 2005, стр. 22-24.
41. Чеканова Т.А., Воробьева М.С., Горбунов М.А. Результаты аттестации вакцины ГАРДА-СИЛ, предназначенной для профилактики заболеваний, вызываемых вирусом папилломы человека. Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней».
42. Горбунов М.А., Икоев В.Н. Оценка иммунологической эффективности и безвредности вакцины инактивированной сапной культуральной в государственных испытаниях. Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», стр. 44.
43. Ельшина Г.А., Горбунов М.А. Эпидемиологическая и экономическая эффективность вакцинации против гриппа взрослого работоспособного населения вакциной Инфлювак. «Эпидемиология. Вакцинопрофилактика», № 2, 2007, стр. 47-53.
44. Павлова Л.И., Вачаев Б.Ф., Горбунов М.А. Результаты клинических испытаний отечественной вакцины против гемофильной типа В-инфекции. БИО препараты, № 4, 2007, стр. 12-15.
45. Ельшина Г.А., Горбунов М.А. Оценка эпидемиологической и экономической эффективности вакцинопрофилактики гриппа среди работающих. БИО препараты, № 4, 2007, стр. 7-11.
46. Горбунов М.А., Ельшина Г.А., Соловьева М.В. Результаты изучения реактогенности и безвредности комбинированной гепатитной ди-(А+В)-вакцины с полиоксидонием – «ГЕПОЛ А+В». БИО препараты, №3-4 (35-36), 2009, стр. 10-13 .
47. Ерофеева М.К., Никифоров И.Ю., Максакова В.Л., Ельшина Г.А., Горбунов М.А. Оценка безопасности и иммунологической активности субъединичной адъювантной вакцины «Гриппол НЕО». «Эпидемиология. Вакцинопрофилактика», № 4 (53), 2010, стр.
48. Regulation and licensing of biological products in countries with newly developing regulatory authorities. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-fifth report. Geneva, World Health Organization, 1995, Annex 1 (WHO Technical Report Series, No. 858).
49. Guidelines for good clinical practices (GCP) for trials on pharmaceutical products. In: WHO Expert Committee on the Use of Essential Drugs, Sixth report. Geneva, World Health Organization, 1995, (WHO Technical Report Series, No. 850), Annex 3.
50. Good manufacturing practices for pharmaceutical products. In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Thirty-second report. Geneva, World Health Organization, 1992, (WHO Technical Report Series, No. 823), Annex 1.
51. Good manufacturing practice: supplementary guidelines for the manufacture of the investigational pharmaceutical products for clinical trials in humans. In: WHO Expert Committee on Specifications

- for Pharmaceutical Preparations. Thirty-fourth report. Geneva, World Health Organization, 1996, Annex 7 (WHO Technical Report Series, No. 863).
- 52.. Good manufacturing practices for biological products. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-second report. Geneva, World Health Organization, 1992 (WHO Technical Report Series, no. 822), Annex 1.
  53. Guidelines for national authorities on quality assurance for biological products. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-Second report. Geneva, World Health Organization, 1992, Annex 2 (WHO Technical Report Series, No. 822).
  54. Recommendations and guidelines for biological substances used in medicine and other documents. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-ninth report. Geneva, World Health Organization, 2000, Annex 3 (WHO Technical Report Series, No. 897).
  55. Guidelines for the evaluation of *Plasmodium falciparum* vaccines in the population exposed to natural infection. Geneva, World Health Organization, 1997.
  56. Guidelines for the evaluation of dengue vaccines in populations exposed to natural infection. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2002 (TDR/IVR/DEN/02.1). ECB text 96 19/11/2004, 09:48 AM Black 97 G.
  57. Immunization in Practice. Geneva, World Health Organization 1998, (Global Programme for Vaccines and Immunization. Expanded Programme on Immunization) (document WHO/EPI/TRAM/98.01-11REV.1).
  58. Organisation for Economic Co-operation and Development principles on Good Laboratory Practice, Paris, OECD, 1998 (ENV/MC/CHEM (98)17).
  59. Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines. London, CPMP, 1998 (document CPMP/SWP/465/95).
  60. Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for guidance on pharmaceutical and biological aspects of combined vaccines. London, CPMP, 1999 (document CPMP/BWP/477/97).
  61. Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry for the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: production, testing and clinical studies. Rockville, MD US Food and Drug Administration, 1997.
  62. Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry for the submission of chemistry, manufacturing, and controls information for synthetic peptide substances. Rockville, MD, US Food and Drug Administration, 1994.
  63. World Medical Association, Declaration of Helsinki: Recommendations Guiding Physicians in Biomedical Research Involving Human Subjects. (Available on the Internet at [www.wma.net/e/](http://www.wma.net/e/)).
  64. Operational guidelines for ethics committees that review biomedical research. Geneva, World Health Organization, 2000.
  65. International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects. Geneva, Council for International Organizations of Medical Sciences, 1993.
  66. Ethics and research on human subjects — international guidelines. In: Bankovski Z, Levine RJ, eds. Proceedings of the twenty-sixth CIOMS Conference, Geneva, 5–7 February 1992.
  67. Ethical considerations in HIV preventive vaccine research. Guidance document. Geneva, UNAIDS, 2000.
  68. Note for guidance on ethnic factors in the acceptability of foreign clinical data (ICH topic E 5, September 1998). Committee for Proprietary Medicinal Products, 1998 (CPMP/ICH/289/95).
  69. Note for guidance on good clinical practice. ICH topic E6. Informal discussion on harmonisation of existing and future requirements for vaccine licensing, testing and production, Brussels, Committee for Proprietary Medicinal Products, 1997 (CPMP/ICH/135/95).
  70. Note for guidance on minimizing the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via medicinal products. Committee for Proprietary Medicinal Products, 1998 (CPMP/BWP/1230/98 revision).
  71. Note for guidance on quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products (ICH topic Q5C). Committee for Proprietary Medicinal Products, 1996 (CPMP/ICH/138/95). ECB text 97 19/11/2004, 09:48 AM Black 98 G.
  72. Note for guidance on quality of biotechnology products: viral safety, evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. (ICH topic Q5A). Committee for Proprietary Medicinal Products, 1997 (CPMP/ICH/295/95).
  73. Note for guidance on preclinical safety evaluation of biotechnology derived pharmaceuticals (ICH topic S 6). Committee for Proprietary Medicinal Products, 1998 (CPMP/ICH/302/95).

74. Note for guidance on specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products (ICH topic Q6B). Committee for Proprietary Medicinal Products, 1999 (CPMP/ICH/365/96).
75. Causality classification in the European Community. (EC Directive III/3445/91).
76. Note for guidance on clinical evaluation of new vaccines. Committee for Proprietary Medicinal Products, 1999 (CPMP/EWP/436/97).
77. European Commission. Pharmaceuticals and Cosmetics. Notice to Applicants. A Guideline on Summary of product characteristics. December 1999.
78. Note for guidance on population exposure: the extent of population exposure to assess clinical safety (ICH Topic E1A). Committee for Proprietary Medicinal Products, 1995 (CPMP/ICH/375/95).
79. Note for guidance on clinical safety data management: data elements for transmission of individual case safety reports (ICH topic E2B). Committee for Proprietary Medicinal Products, 1998 (CPMP/ICH/287/95).
80. Notice to marketing authorization holders. Pharmacovigilance guidelines. Committee for Proprietary Medicinal Products, Draft version, January 1999 (CPMP/PhVWP/108/99).
81. Ethics and Epidemiology: International Guidelines In: Bankowski Z, Bryant JH, Last JM eds. Proceedings of the twenty-fifth CIOMS Conference. Geneva, Council for International Organizations of Medical Sciences, 1991.
82. Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry: Providing clinical evidence of effectiveness for human drug and biological products. Rockville, MD, US Food and Drug Administration, 1998.
83. Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry. How to complete the vaccine adverse event reporting system form (VAERS – 1). Rockville, MD, US Food and Drug Administration, 1998. 37. International reporting of adverse drug reactions. Final report of the CIOMS Working group. Geneva, Council for International Organizations of Medical Sciences, 1990.
84. International guidelines for ethical review of epidemiological studies. Geneva, Council for International Organizations of Medical Sciences, 1991.
85. Note for Guidance on statistical principles for clinical trials (ICH topic E9). Committee for Proprietary Medicinal Products, 1998 (CPMP/ICH/363/96). ECB text 98 19/11/2004, 09:48 AM Black 99 G.
86. Griffiths E, Knezevic I. Assuring the quality and safety of vaccines: regulatory expectations for licencing and batch release. In: Robinson A, Cranage M, Hudson M, eds. Methods in molecular medicine: vaccine protocols. Totowa New Jersey, Humana Press, 2003, 353–376.
87. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of Biologicals. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-seventh report. Geneva, World Health Organization, 1998, Annex 1 (WHO Technical Report Series, No. 878).
88. Guidelines for assuring quality of DNA vaccines. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-seventh report. Geneva, World Health Organization, 1998, Annex 3 (WHO Technical Report Series, No. 878).
89. Guidelines for assuring the quality of pharmaceutical and biological products prepared by recombinant DNA technology. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-first report. Geneva, World Health Organization, 1991, Annex 3 (WHO Technical Report Series, No. 814).
90. Guidelines for the production and quality control of synthetic peptide vaccines. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-eighth report. Geneva, World Health Organization, 1999, Annex 1 (WHO Technical Report Series, No. 889).
91. General requirements for the sterility of biological substances. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Twenty-fifth report. Geneva, World Health Organization, revised 1973, Annex 3 (WHO Technical Report Series, No. 530); Amendment In: Expert Committee on Biological Standardization. Forty-sixth report. Geneva, World Health Organization, 1998, Annex 3 (WHO Technical Report Series, No. 872).
92. WHO guidelines on Transmissible Spongiform Encephalopathies in relation to biological and pharmaceutical products. Geneva, World Health Organization, 2003 (document, WHO/BCT/QSD/03.01).
93. Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for Industry. Content and format of chemistry, manufacturing and controls information and establishment description information

- for a vaccine or related product. Rockville, MD, US Food and Drug Administration, 1999, 64:518–519.
94. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenza* type b conjugate vaccines. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-ninth report. Geneva, World Health Organization, 2000, Annex 1 (WHO Technical Report Series, No. 897).
  95. Goldenthal KL et al. Safety evaluation of vaccine adjuvants: national cooperative vaccine development meeting working group. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 1993, 9 (suppl. 1):S47–S51.
  96. Requirements for poliomyelitis vaccine (oral) (Addendum 1998). In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-ninth report. Geneva, World Health Organization, 2000, Annex 2 (WHO Technical Report Series, No. 897).
  97. Smith PG, Morrow RH. Field trials of health interventions, 2nd ed. Geneva, World Health Organization 1996. ECB text 99 19/11/2004, 09:48 AM Black 100 G.
  98. Clemens J et al. Evaluating new vaccines for developing countries. Efficacy or effectiveness? *Journal of the American Medical Association*, 1996, 275:390–397.
  99. Giesecke J. Modern infectious disease epidemiology. Oxford, Arnold/Oxford University Press, 1995.
  100. Halloran ME, Struchiner CJ, Longini IM. Study designs for evaluating different efficacy and effectiveness aspects of vaccines. *American Journal of Epidemiology*, 1997, 146:789–803.
  101. Anderson RM, Donnelly CA, Gupta S. Vaccine design, evaluation and community based use for antigenically variable infectious agents. *Lancet*, 1997, 350:1466–1470.
  102. Durham KL et al. Estimation of vaccine efficacy in the presence of waning: application to cholera vaccines. *American Journal of Epidemiology*, 1998, 147:948–959.
  103. Halloran ME, Struchiner CJ. Causal inference and infectious diseases. *Epidemiology*, 1995, 6:142–151.
  104. Horne AD, Lachenbruch PA, Goldenthal KL. Intent-to-treat analysis and preventive vaccine efficacy. *Vaccine*, 2000, 19:319–326.
  105. Lachenbruch PA. Sensitivity, specificity, and vaccine efficacy. *Controlled Clinical Trials*, 1998, 19:569–574.
  106. Ewell M. Comparing methods for calculating confidence intervals for vaccine efficacy. *Statistics in Medicine*, 1996, 15:2379–2392.
  107. Blackwelder WC. Similarity/ equivalence trials for combination vaccines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1995, 754:321–328.
  108. Folb P. In Grady JO, Joubert PH. Handbook of phase I/II clinical drug trials. CRC Publishers, 1997.
  109. Horne AD. The statistical analysis of immunogenicity data in vaccine trials: a review of methodologies and issues. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1995, 754:329–346.
  110. Reed GF, Meade BD, Steinhoff MC. The reverse cumulative distribution plot: a graphic method for exploratory analysis of antibody data. *Pediatrics*. 1995, 96:600–603.
  111. Horne AD. Statistics, use in immunology. In: *Encyclopaedia of immunology*. London, Academic Press, 1998.
  112. Hayes RJ et al. MRC Tropical Epidemiology Group. Design and analysis issues in cluster-randomized trials of interventions against infectious diseases. *Statistical Methods in Medical Research* 2000, 9:95–116.
  113. Orenstein WA et al. Field evaluation of vaccine efficacy. *Bulletin of the World Health Organization*, 1985, 63:1055–1068. 69. Olin P et al. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole cell pertussis vaccine. *Lancet*, 1997, 350:1569–1577. ECB text 100 19/11/2004, 09:48 AM Black 101 G.
  114. Smith PG, Rodrigues LC, Fine PEM. Assessment of the protective efficacy of vaccines against common diseases using case control and cohort studies. *International Journal of Epidemiology*, 1984, 13:87–93.
  115. Siber GR. Methods for estimating serological correlates of protection. In: Brown, F et al. eds. *Pertussis vaccine trials: Developments in Biological Standardization*. Basel, Karger, 1997, 89:283–296.

116. Committee for Proprietary Medicinal Products. 1994 Note for guidance on environmental risk assessment for human medicinal products containing or consisting of GMOs. (CPMP/III/5507/94).
117. Fedson DS. Measuring protection: efficacy versus effectiveness. In: Brown F, Plotkin S, eds. Preclinical and clinical development of vaccines. Developments in Biological Standardization 1998, 95:195–201.
118. Jefferson T. Vaccination and its adverse effects: real or perceived. British Medical Journal, 1998, 317:159–160.
119. Taylor B et al. Autism and measles, mumps and rubella vaccine: no epidemiological evidence for a causal relationship. Lancet, 1999, 353:2026– 2029.
120. Chen RT, Orenstein WA. Epidemiologic methods in immunization programmes. Epidemiology Review, 1996, 18:99–117.
121. Rodrigues LC, Smith PG. Use of the case-control approach in vaccine evaluation: Efficacy and adverse effects. Epidemiologic Reviews, 1999, 21:56–72.
122. Falk LA et al. Testing and licensure of combination vaccines for the prevention of infectious diseases. In: Ellis RW ed. Combination vaccines: Development, clinical research and approval. Totowa, NJ, Humana Press, 1999, 233–248.
123. WHO recommended surveillance standards. Geneva, World Health Organization, 1997 (document WHO/EMC/DIS/97.1).
124. Horne AD et al. Analysis of studies to evaluate immune response to combination vaccines. Clinical Infectious Diseases, 2001 33(Suppl 4):5306– 5311.
125. Protocols for the evaluation of epidemiological surveillance systems. Geneva, World Health Organization, 1997 (document WHO/EMC/DIS/97.2).
126. Surveillance of adverse events following immunization. Field guide for managers of immunization programmes. Geneva, 1997 (document WHO/ EPI/TRAM/93.02 Rev.1).
127. Aylward B et al. A framework for the evaluation of vaccines for use in the expanded programme on immunization. Vaccine, 1994, 12:1155–1159.



Индивидуальная регистрационная карта испытуемого

Исследуемый препарат \_\_\_\_\_  
Серия вакцины \_\_\_\_\_  
Код привитого \_\_\_\_\_  
Дата рождения (возраст) \_\_\_\_\_  
Дата взятия крови до вакцинации \_\_\_\_\_  
Результат исследования крови до вакцинации \_\_\_\_\_  
Дата вакцинации \_\_\_\_\_  
Дата взятия крови после вакцинации (I, II, III) \_\_\_\_\_  
Результаты исследования крови после вакцинации \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Перечень регистрируемых реакций	Дни наблюдения после вакцинации														
	1 прививка					2 прививка					3 прививка				
	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день
Температура тела (°C)															
Недомогание															
Головная боль															
Тошнота															
Рвота															
Нарушение сна															
Беспокойство															
Боль в животе															
Нарушение стула															
Боль в месте инъекции (+, -)															
Покраснение (мм)															
Припухлость (мм)															
Увеличение лимфоузлов															

Дата окончания наблюдения \_\_\_\_\_  
Подпись врача, проводившего наблюдения \_\_\_\_\_ (Ф.И.О.)

**ФОРМА ИНФОРМИРОВАННОГО СОГЛАСИЯ ДОБРОВОЛЬЦА  
НА УЧАСТИЕ В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ  
(указывается исследуемый препарат)**

Я,

осведомлён врачом-исследователем обо всех аспектах планируемых клинических испытаний (указать исследуемый препарат).

Я получил информацию о целях, задачах и сущности клинических испытаний, сведения о препарате, ожидаемой его эффективности и безопасности, о пользе и степени риска при участии в клинических испытаниях, о своих правах и обязанностях. Я предупрежден о возможном дискомфорте, нежелательных и побочных явлениях и о моих действиях в случае возникновения непредвиденных эффектов при введении препарата.

Я имел возможность обсудить с врачом-исследователем все интересующие меня вопросы, и удовлетворен полученными ответами.

Я информирован о том, что буду включен в исследования только после того, как пройду полное в соответствии с инструкцией по применению обследования и мое медицинское и физическое состояние будут соответствовать условиям включения в данное испытание.

Я добровольно, осознанно соглашаюсь принять участие в клиническом испытании препарата (название), извещен, что имею право отказаться или в любой момент прекратить участие в данном испытании.

Я согласен выполнять инструкции, добросовестно сотрудничать с врачом-исследователем и немедленно сообщать ему о любом нарушении со стороны моего здоровья.

Я извещен, что если моему здоровью будет нанесен ущерб, связанный с непосредственным введением испытываемой вакцины или медицинской процедурой, предусмотренной планом клинического испытания, мне будет оказана необходимая медицинская помощь, затраты на которую будут возмещены страховой компанией, в которой я застрахован. Сумма возмещения может быть пересмотрена Страховой компанией в случае, если ухудшение моего здоровья возникло при несоблюдении мною предписаний врача.

Я оповещен, что информация обо мне и моих медицинских данных будет конфиденциальной и может быть раскрыта только официальным представителем при соблюдении анонимности.

Подписывая форму Информированного согласия, я даю свое разрешение на доступ к медицинским данным, полученным в исследовании, учреждению-разработчику препарата, организации, ответственной за проведение клинического исследования, представителям Комитета по этике, официальным представителям Министерства здравоохранения и социального развития.

Я получил подписанный и датированный экземпляр информации для добровольца с формой информированного согласия на ... страницах.

Подпись добровольца \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
Подпись ФИО

Дата (пишется добровольцем) «\_\_\_» \_\_\_\_\_ г.

Подпись врача – исследователя \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
Подпись ФИО

Дата (пишется врачом-исследователем) «\_\_\_» \_\_\_\_\_ г.

## ГЛАВА 6

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА

#### 6.1. КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИНАКТИВИРОВАННЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

*СОСТАВИТЕЛИ: акад. РАМН О.И. Киселев, д.м.н. М.К. Ерофеева, к.м.н. М.А. Стукова, к.м.н. Н.И. Лонская, ГУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, Центр экспертизы и контроля МИБП*

Гриппозные вакцины были и остаются основным средством специфической профилактики гриппа. На сегодняшний день в мировой практике для вакцинации против гриппа используются два вида вакцин: инактивированные гриппозные вакцины (ИГВ) и живые гриппозные вакцины (ЖГВ). Все сезонные гриппозные вакцины как живые, так и инактивированные, являются трехкомпонентными, то есть содержат актуальные штаммы вирусов гриппа трех антигенных подтипов А (H1N1), А (H3N2) и В; пандемические гриппозные вакцины являются моновалентными и производятся на основе одного пандемического штамма вируса гриппа А. В случае совпадения вакцинного штамма и этиологического агента, вызвавшего эпидемию (пандемию), эффективность вакцинации может достигать 70% в различных группах населения.

В подавляющем большинстве стран для защиты населения от гриппа применяют инактивированные гриппозные вакцины. Данный вариант гриппозных вакцин имеет высокий уровень безопасности и хорошо переносится. Выделяют три основных типа ИГВ: цельновирионные, расщепленные и субъединичные. Инактивированные *цельновирионные* вакцины содержат цельные вирусы гриппа, прошедшие предварительную инактивацию и очистку. При изготовлении вакцины вирус гриппа выращивается на куриных эмбрионах или культуре клеток, затем выделяется и инактивируется. *Сплит-вакцины (расщепленные)* содержат частицы разрушенного вируса – поверхностные и внутренние белки. Изготавливается вакцина путем расщепления вирусных частиц при помощи органических растворителей или детергентов. При парентеральном (внутримышечном) введении данные типы ИГВ вызывают выработку высоких уровней сывороточных антител, преимущественно вирус-специфических иммуноглобулинов класса G (в первую очередь IgG1), а также IgM и IgA, но в более низких концентрациях. Антитела, вырабатываемые после вакцинации цельновирионными и расщепленными ИГВ, в основном типоспецифичны; кросспротективность обеспечивается за счет выработки антител к внутренним белкам вируса (М, NP). *Субъединичные вакцины* основаны на использовании очищенных поверхностных вирусных белков. В случае с вирусом гриппа вакцина содержит только два поверхностных гликопротеина – гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA) и максимально очищена от балластных белков. Основной недостаток субъединичных вакцин связан с меньшей иммуногенностью по сравнению с цельновирионными и расщепленными вакцинами.

Включение в состав вакцинного препарата адъюванта значительно повышает иммуногенность вакцины и позволяет максимально снизить дозу вводимого антигена, что в свою очередь приводит к снижению реактогенности вакцины. В клинической практике наиболее часто используемым адъювантом является гидроксид алюминия. Адъювант-

ное действие гидрооксида алюминия долгое время связывалось с его способностью адсорбировать на своей поверхности антигены, продлевая тем самым период высвобождения антигена, и, следовательно, время контакта антигена с антиген-презентирующими клетками. Однако в дальнейшем было показано, что высвобождение адсорбированного антигена происходит в первые несколько часов после инъекции, а адъювантное действие гидрооксида алюминия обусловлено тем, что антиген презентруется в корпускулярной форме, обеспечивая более эффективный фагоцитоз. Кроме того, гидрооксид алюминия активирует систему комплемента и при внутримышечном введении стимулирует образования воспалительного комплекса привлекающего иммунокомпетентные клетки, что приводит к образованию гранул с большим содержанием АТ-продуцирующих плазмочитов. Введение адъюванта в состав вакцины сопровождается активацией каспазы-1 и способствует образованию зрелой формы ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-18, которые в свою очередь обладают доказанным адъювантным эффектом (Li et al., 2007).

Несмотря на очевидность благоприятного соотношения между ожидаемым полезным эффектом и возможным риском при применении современных противогриппозных вакцин, проводятся интенсивные научные исследования по их усовершенствованию. При этом ставятся задачи повышения профилактической эффективности имеющихся вакцин, нахождения альтернативных путей их введения, создания улучшенных вариантов гриппозных вакцин и поиск новых адъювантов, а также усовершенствование процесса производства вакцин. Последняя задача представляется особенно важной в экстренных ситуациях в случае угрозы пандемии при возникновении острой потребности в больших количествах вакцины.

Исследования ведутся по целому ряду направлений. Спектр исследований охватывает адъюванты, живые вакцины для интраназального введения, липосомы, вирус-липосомные вакцины, иммуномодулирующие комплексы (ISCOMS), синтетические пептиды и рекомбинантные вакцины, ДНК-вакцины и альтернативные пути введения вакцин. Для обеспечения большей гибкости производства вакцин в настоящее время разрабатываются гриппозные вакцины на основе клеточных культур. Расширение наших знаний об иммунной системе показали, что помимо системных антител, свой вклад в защитную эффективность вакцин вносят и другие компоненты иммунной системы, в том числе, локальные антитела IgA и клеточный иммунитет (Cox et al., 2004). Эти компоненты иммунной системы необходимо стимулировать, чтобы они, в свою очередь, могли усиливать защитный эффект вакцинации.

Научные исследования в области разработок гриппозных вакцин должны отвечать особым требованиям. Целью разработки гриппозных вакцин (как сезонных, так и пандемических) является профилактика заболевания среди здорового населения. Поэтому в большинстве клинических исследований, включая все фазы, участниками исследований являются здоровые добровольцы. Поскольку вакцины вводятся здоровым людям, в том числе детям, они должны соответствовать общепринятым нормам безопасности и пользоваться доверием у вакцинируемых людей. При этом конечный критерий оценки достоинств новой вакцины должен отражать улучшенное соотношение между ожидаемым полезным эффектом и возможным риском при ее применении. Большую роль в выполнении данных требований играют проводимые в соответствии со стандартами GCP клинические исследования. Они позволяют выбрать оптимальную дозу/схему вакцинации, оценить переносимость и, в конечном итоге, профилактическую эффективность вакцины благодаря проведению крупномасштабных исследований среди широких слоев населения. В соответствии с планом клинических исследований нового вакцинного препарата соблюдается определенная последовательность проведения клинических исследований гриппозных вакцин. После того как завершены клинические исследования у здоровых взрослых добровольцев, выбрана оптимальная, с точки зрения эффективности, доза и схема введения вакцины, показана безопасность и безвредность препарата, приступают к клиническим исследованиям на контингентах, относящихся к группам высокого риска

заражения гриппом и высокого риска развития осложнений заболевания. К этим группам относятся дети всех возрастов и лица пожилого возраста, как правило, страдающие многочисленными хроническими заболеваниями. Окончательное подтверждение более высокой эффективности каждой новой вакцины должно быть получено на основании результатов клинических исследований в сравнении с уже существующими вакцинами. При проведении исследований в этой области необходимо руководствоваться нормативными требованиями, которые установлены национальными и международными органами здравоохранения.

## **ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН**

Решение задачи клинического исследования по оценке безопасности и переносимости вакцины при парентеральном введении (ИГВ), определяется по клиническим показателям и симптомам (нежелательным явлениям), а также данным лабораторных исследований. Обычно для оценки реактогенных свойств вакцины за добровольцами проводится активное амбулаторное наблюдение в течение 7 дней после вакцинации, однако часто при проведении 1 фазы клинических исследований, добровольцам предлагается стационарное наблюдение в течение этого срока после первой или после каждой вакцинации. Оценка безопасности вакцины предполагает определение ряда лабораторных показателей до введения первой дозы вакцины, а также их изменений в ходе исследования. При этом заранее определяются перечень лабораторных показателей, имеющих клиническую значимость для проводимого исследования, и нормальные диапазоны лабораторных показателей.

Определение доли лиц, у которых было зарегистрировано развитие нежелательных явлений (НЯ), проводится по четырем нижеследующим категориям:

1. Нежелательные явления немедленного типа, возникающие в течение двух часов после каждой (или однократной) вакцинации и выявленные как медицинским персоналом, так и по информации, сообщенной вакцинируемым лицом персоналу исследования.

2. Нежелательные явления (предвиденные клинические проявления местного и системного характера), как правило, наблюдаемые вследствие внутримышечной (ИГВ) вакцинации и возникающие в период через два часа и до 7-го дня после введения какой-либо дозы исследуемого вакцинного препарата.

3. Другие нежелательные явления (включая непредвиденные клинические проявления), возникающие в течение 7 дней после введения какой-либо дозы исследуемой вакцины. При этом также учитывают патологические изменения данных лабораторных анализов крови (общий клинический и биохимический) и мочи, собранных в контрольные дни исследования.

4. Все серьезные нежелательные явления (СНЯ), возникающие в период до 4-х недель после каждой (или однократной) вакцинации. При этом также учитывают патологические изменения данных лабораторных анализов крови и мочи, собранных в контрольные дни исследования (для ИГВ целесообразно взятие образцов для лабораторных анализов до вакцинации и через 24-48 часов).

Подсчет всех нежелательных явлений производится в соответствии с тяжестью явления, как «любое местное нежелательное явление», или «любое системное нежелательное явление», а также по отношению к введению исследуемой вакцины, исходя из заключения врача-исследователя при слепом методе исследования. Возникновение нежелательного явления, связь с введением препарата которого оценена как «определенная», «вероятная», «возможная», или «неизвестная», необходимо рассматривать как взаимосвязанное с проводимой вакцинацией (таблица 1).

Потенциальные нежелательные явления, которые могут развиваться в ответ на введение инактивированной гриппозной вакцины (местные и системные реакции) указываются в таблице 2.

Таблица 1

*Оценка причинно-следственной связи  
нежелательных явлений в результате введения препарата*

Определение взаимосвязи	Характеристика причинно-следственной связи
<b>ВЫСОКОВЕРОЯТНАЯ/ ОПРЕДЕЛЕННАЯ</b>	Развитие клинических проявлений происходит в определенный временной интервал после введения вакцины и не может быть обосновано наличием какого-либо сопутствующего заболевания или приема каких-либо других лекарственных препаратов.
<b>ВЕРОЯТНАЯ</b>	Наличие данных, подтверждающих предположение о наличии причинно-следственной связи с введением препарата; влияние какого-либо сопутствующего заболевания или приема каких-либо других лекарственных препаратов маловероятно.
<b>ВОЗМОЖНАЯ</b>	Наличие данных, подтверждающих предположение о наличии причинно-следственной связи с введением препарата; может быть обусловлено также и влиянием какого-либо сопутствующего заболевания или приема каких-либо других лекарственных препаратов.
<b>МАЛОВЕРОЯТНАЯ</b>	Побочная реакция не возникает в допустимый временной интервал после введения исследуемого препарата, случайная связь возможна, но маловероятна. Может быть преимущественно обосновано наличием других заболеваний или приемом каких-либо других лекарственных препаратов.
<b>НЕСВЯЗАННАЯ</b>	Побочная реакция не возникает в допустимый временной интервал после введения исследуемого препарата. Может быть обоснована наличием других заболеваний или приемом каких-либо других лекарственных препаратов.
<b>НЕИЗВЕСТНАЯ</b>	Невозможность оценить наличие причинно-следственной связи с введением препарата ввиду недостаточности информации и выявления причины клинического проявления.

Таблица 2

*Характеристика возможных нежелательных явлений  
(местные и системные реакции) при введении инактивированных гриппозных вакцин*

Тип вакцины/способ введения	Местные реакции	Системные реакции
<b>ИГВ/(парентерально)</b>	В месте инъекции: Болезненность Гиперемия Отечность Развитие инфильтратов	Повышение температуры тела (необходимо указать область измерения температуры тела) Лихорадочное состояние/субъективное ощущение лихорадки Озноб Кашель (указать, влажный или сухой) Затрудненное дыхание Воспаленное горло Головная боль Спутанное сознание Спазмы/судороги Усталость/недомогание Боль в суставах Боль в мышцах Конъюнктивит или кровоизлияние в глаз Сухость глаз Воспаленные веки (конъюнктивит) Боль в ушах или выделения из уха Сыпь Боли в животе Диарея Рвота

## ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

Оценка формирования иммунного ответа при проведении клинических исследований гриппозных вакцин осуществляется по доле лиц, у которых после введения какой-либо из доз исследуемого вакцинного препарата выявлен не менее чем четырехкратный подъем титров антител по сравнению с базовыми показателями, или по уровню среднего геометрического титра после каждой вакцинации, определяемых согласно нижеследующим показателям:

1. Содержание сывороточных антител по данным РТГА.
2. Содержание сывороточных нейтрализующих антител в реакции микронеutralизации.
3. Содержание сывороточных IgA (иммуноглобулины класса А) или IgG (иммуноглобулины класса G) антител (по данным ИФА).

При оценке иммуногенной активности вакцины используются параметры, оговоренные в руководстве по гармонизации требований к противогриппозной вакцине Комитета по патентованным лекарственным препаратам (CPMP).

Иммуногенная активность вакцины оценивается по проценту привитых с достоверными 4-кратными и более приростами титров антител во вторых сыворотках (сероконверсии), а также средним геометрическим титрам антител, кратности приростов титров антител и доле лиц (%) с защитными титрами противовирусных антител. Согласно Европейским критериям ежегодной регистрации сезонных инактивированных гриппозных вакцин (ИГВ) для лиц в возрасте 18-60 лет вакцинация должна приводить к увеличению среднегеометрического титра антител в 2,5 раза; к 4-кратным сероконверсиям у 40% и более лиц; число лиц с защитными титрами антител должно составлять более 70% (таблица 3).

*Таблица 3*

*Критерии иммуногенной активности вакцин против гриппа человека  
(CPMP EMEA, CPMP/EWP/1045/01)*

Параметры иммуногенности	Возрастная группа	
	18-60 лет	старше 60 лет
Фактор сероконверсии (повышение средних геометрических титров антител по сравнению с исходным уровнем, выражается в кратности увеличения)	Более 2,5	Более 2,0
Уровень сероконверсии (отношение количества добровольцев, у которых титр антител (не менее 1: 40) повысился более чем в 4 раза по сравнению с исходным уровнем)	Более 40%	Более 30%
Уровень серопротекции (процент лиц, у которых титр антител составляет более 1:40)	Более 70%	Более 60%

Оценка системного иммунного ответа (иммуногенной активности вакцины) проводится с помощью методов реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием различных индикаторных систем (эритроциты петуха, если другие эритроциты специально не предусмотрены) в зависимости от штамма вируса гриппа, включенного в состав исследуемой вакцины, реакции микронеutralизации (PMH) и иммуноферментного анализа (ИФА). При постановке РТГА и PMH используются образцы парных сывороток крови, предварительно обработанных рецептор-разрушающим энзимом (RDE).

Результаты исследований по иммуногенности отражаются в специальной таблице, форма которой приводится в таблице 4.

Таблица 4

*Форма заполнения данных по иммуногенности для гриппозных вакцин*

Группы	Препараты	Исходный уровень антител	Число лиц с парными сыворотками	Из них с 4-кратными сероконверсиями во 2-й порции		СГТА		Кратность нарастания титров антител	К-во лиц с защитными титрами антител 1:40 и выше	
				абс.	% ± m	до вакцинации	после вакцинации		абс.	% ± m
I	Вакцина	< 20								
	Плацебо (или препарат сравнения)									
II	Вакцина	> 40								
	Плацебо (или препарат сравнения)									

В связи с постоянной изменчивостью вируса гриппа, ежегодно меняется штаммовый состав гриппозных вакцин, что вызывает необходимость проведения ограниченных клинических испытаний зарегистрированных вакцин, изготовленных для предстоящего эпидемического сезона из эпидемически актуальных штаммов.

Задачами таких исследований являются:

Определение реактогенности вакцины.

Изучение иммуногенности препарата.

Исследования проводятся в соответствии Правилам клинической практики.

Штаммовый состав должен соответствовать по антигенной структуре антигенно актуальным штаммам, рекомендованным ВОЗ и Комиссией по гриппозным вакцинным штаммам на предстоящий эпидсезон (последняя, анализируя эпидситуацию в Российской Федерации рассматривает соответствие актуальности для нашей страны штаммов и рекомендованных ВОЗ).

Серии вакцин, используемые для испытания, должны быть приготовлены на предприятии-производителе испытуемой вакцины.

Реактогенность и иммуногенность оценивается на группе лиц в возрасте 18-60 лет в количестве 50 человек. Лица, получившие вакцину в течение предшествующих 6 месяцев, должны быть исключены из обследуемых.

Реактогенность оценивается в течение 5 дней по показателям местных реакций (покраснение, припухлость, инфильтраты, болезненность на месте введения) и общих реакций (температура, головная боль, мышечные боли и другие проявления).

Для оценки иммуногенности должны быть взяты парные сыворотки (до вакцинации и через 21-28 дней после вакцинации).

Парные сыворотки титруются одновременно в РТГА с эритроцитами петуха. Результат менее 1:10 оценивается как 1:5.

Показатели иммуногенности:



Число лиц с четырехкратным или более увеличением титра антител (сероконверсия) должно быть  $> 40\%$ .

Увеличение среднегеометрического титра  $> 2,5$  раза.

Процент лиц с защитным титром антителом  $\geq 40$  должно быть  $> 70\%$ .

По крайней мере, один показатель должен отвечать вышеуказанным требованиям.

Оценка показателей реактогенности и иммуногенности позволяет сделать заключение о целесообразности включения актуальных штаммов вакцины для профилактики гриппа в предстоящем эпидсезоне.

## **6.2. КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИВЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН**

*СОСТАВИТЕЛИ: акад. РАМН О.И. Кисилев, д.м.н. М.К. Ерофеева, к.м.н. М.А. Стукова, к.м.н. Н.И. Лонская, ГУ НИИ гриппа Минздравоуразвития России, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравоуразвития России, Центр экспертизы и контроля МИБП.*

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

ЖГВ – живая гриппозная вакцина

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ЭКГ – электрокардиограмма

ЭХО-КГ – эхокардиограмма

ELISpot – Enzyme-Linked Immunosorbent Spot (иммуноферментный анализ ELISpot)

IgA – иммуноглобулины класса А

IgG – иммуноглобулины класса G

### **Введение**

Клинические испытания новых живых гриппозных вакцин (ЖГВ) включают исследования, проводимые в ходе разработки продукта, его лицензирования и/или постмаркетинговые исследования.

При клинических исследованиях новых, нелицензированных ЖГВ следует учитывать, что современные сезонные гриппозные вакцины, как правило, трехкомпонентные, которые защищают одновременно от 3 вирусов гриппа А(Н1N1) А(Н3N2) и В, поэтому первоначально должна быть доказана безопасность и эффективность каждого из компонентов, рекомендованных в состав поливалентной живой гриппозной вакцины.

Исследование должно проводиться в соответствии с требованиями Руководства по надлежащей клинической практике (GCP), как установлено действующими регламентирующими актами Российской Федерации: Национальным стандартом РФ ГОСТ 52-379-2005 «Надлежащая клиническая практика» и Федеральным законом РФ от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и другими регламентирующими документами [1, 3-6, 10,11].

Документы информированного согласия на участие волонтеров в исследовании должны включать положения, изложенные в Хельсинкской декларации.

Весь основной персонал данного исследования (лица, ответственные за его подготовку и проведение) должен пройти полный курс обучения «Защита прав участников исследования» до начала взаимодействия с участниками исследования или получения доступа к их конфиденциальным данным, относящимся к исследованию. В соответ-

ствии с требованиями ГОСТ Р 52379-2005 п. 2.12 [4] производство и хранение исследуемых продуктов, а также обращение с ними, должно осуществляться в соответствии с правилами надлежащей производственной практики [8, 9]. Препарат исследования, а также препарат сравнения и/или плацебо должны быть закодированы и маркированы таким образом, чтобы соответствовать нормативным требованиям (ГОСТ 52379-2005 п. 5.13.1) [4]. Лекарственная форма плацебо и его внешний вид должны быть сходны с исследуемой вакциной, и метод введения плацебо должен быть аналогичен методу введению вакцины. При проведении последующих фаз клинических испытаний возможна замена плацебо на препарат «активного контроля» (инактивированную гриппозную вакцину).

Подробное руководство относительно клинических испытаний вакцин для производителей и для контролирующих органов содержится в рекомендациях ВОЗ по клиническим испытаниям вакцин [21, 23]. Руководство по отношению к клиническим испытаниям противогриппозной вакцины (человеческая, живая аттенуированная) содержится в рекомендациях ВОЗ по нормативно-правовой готовности вакцин против пандемического гриппа [18, 19].

Информация, необходимая для успешного завершения клинических испытаний, может быть различной в зависимости от природы вакцины; по этой причине планы клинических испытаний должны быть согласованы с государственными регулирующими органами.

Решение о временном приостановлении проведения исследования может быть принято спонсором, Министерством здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Советом по этике и локальным Комитетом по этике, курирующими данное исследование, а также исследователем в любое время при возникновении опасений, связанных с безопасностью исследуемого препарата. К факторам, вызывающим опасения, относятся: развитие серьезных нежелательных явлений (СНЯ), обусловившее смертельный исход, необычно высокая частота развития НЯ или начало активной циркуляции сезонного вируса гриппа среди окружающих. Спонсор вправе временно приостановить проведение исследования в том случае, если установлено несоблюдение стандартов руководства «Надлежащая клиническая практика» (GCP).

В случае появления новых данных, свидетельствующих о повышении уровня риска для участников исследования, клиническое исследование должно быть приостановлено до проведения анализа этих данных спонсором, Министерством здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Советом по этике и локальным Комитетом по этике и принятия согласованного решения о том, что выполнение исследования может быть продолжено.

## **КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ЛИЦЕНЗИРОВАНИЯ**

### **Стратегия клинических исследований**

Первый этап клинических испытаний (Фаза I), особенно в случае работы со штаммами, полученными с использованием ранее неизвестного донора аттенуации, либо подготовленные с использованием пандемических или птичьих вирусов, необходимо проводить в условиях клиник, в максимальной степени гарантирующих изоляцию испытуемых. Рекомендации ВОЗ по оценке рисков биологической безопасности, производству и контролю качества вакцин против пандемического гриппа содержат некоторые указания по данному вопросу [19].

Данная фаза клинических испытаний должна продемонстрировать, что отсутствует возможность передачи вируса от привитых к контактным людям.

Стратегия клинических испытаний новых ЖГВ в целом мало отличается от той, что принята при разработке других вакцин. Однако, учитывая то, что после интраназального введения ЖГВ вакцинные штаммы репродуцируются в верхних дыхательных путях,

первую и вторую фазы клинических испытаний новых ЖГВ необходимо проводить на серонегативных волонтерах, т.е. первичный скрининг. Это требование обусловлено тем, что после введения ЖГВ иммунологически защищенным людям у них отсутствует репродукция вакцинных штаммов.

Этапы клинического изучения представлены в нижеследующей таблице.

*Клинические испытания новых ЖГВ*

Фазы клинических испытаний	Решаемая задача	Объем клинических испытаний
Фаза I	Безопасность и предварительные данные по иммуногенности	Повышение температуры тела (необходимо Испытания ограниченного масштаба для определения, существуют ли значительные риски (20-100 волонтеров)
Фаза II	Оценка безопасности и иммуногенности	Более масштабные испытания для дальнейшего определения рисков и возможной пользы для групп населения, которым предназначена вакцина (100-300 волонтеров)
Фаза III	Эффективность и безопасность	Масштаб исследований определяется необходимостью статистической достоверности значений безопасности и эффективности
Постмаркетинговые клинические испытания	Безопасность и эффективность	Исследования для уточнения данных о безопасности и эффективности вакцинации

Программа и план клинических испытаний должны быть согласованы с государственными регулирующими органами. Первоначальные исследования (Фаза I) сфокусированы на вопросах безопасности, включая такие ее аспекты, как репликация, генетическая стабильность реизолятов и передача вакцинных вирусов контактными лицам, приживляемости, а также изучение нейротоксического и иммунологического воздействия новой ЖГВ. Первые клинические исследования (Фаза I) должны подтвердить безвредность, определить долю лиц, у которых были зарегистрированы любые непредвиденные нежелательные явления (НЯ) либо патологические лабораторные показатели. Кроме того возможна предварительная оценка иммуногенности выбранной дозы ЖГВ.

Данное исследование может быть плацебо контролируемым. Начальным этапом изучения нового препарата на людях является испытание его на добровольцах обоего пола в возрасте 18-50 лет. При формировании групп следует предусматривать их равноценность по таким признакам, как пол, возраст, показатели специфического иммунитета (ко всем гриппозным штаммам, входящим в состав вакцины) и т.п.

Дальнейшие клинические испытания (Фазы II и III) проводятся на большем количестве лиц по отдельным группам населения, для защиты которых предназначена ЖГВ, с целью определить тип и частоту случаев неблагоприятного воздействия, которые могут быть выявлены лишь при вакцинации достаточно большого числа людей.

Последующие клинические исследования должны также оценить возможное неблагоприятное воздействие вакцинации на лиц различных возрастных групп. При расширении исследований безопасности необходимо изучить воздействие ЖГВ на людей, страдающих расстройствами дыхательной, сердечно-сосудистой или иммунной систем. Кроме того, желательно установить иммунологические показатели вакцины.

### **Изучение безвредности**

Каждый испытуемый должен быть проинформирован о целях, методах, предвидимых выгодах и возможном риске исследования, а также уведомлен о своем праве отказа от участия в исследовании. Добровольцы не должны иметь служебной или иной зависи-

мости от лиц, имеющих отношение к проведению испытаний и (или) заинтересованных в его результате. Медицинское учреждение, проводящее испытание, должно получить такое согласие в письменном виде, гарантируя при этом обеспечение в случае необходимости оказания соответствующей медицинской помощи в течение всего периода наблюдения. Врач-исследователь проводит осмотр добровольцев, оценивает результаты исследования биохимических показателей и общего клинического анализа крови с определением лейкоцитарной формулы крови, анализирует результаты серологических исследований на наличие хронических вирусных инфекций. Добровольцев-женщин тестируют на наличие беременности. При интраназальном или пероральном введении новой ЖГВ, в Фазе I необходимо оториноларингологическое обследование волонтеров. К участию в исследовании допускаются только практически здоровые лица.

В день прививки вакцинируемые должны быть повторно осмотрены врачом и не иметь противопоказаний к вакцинации. Обязательно проводится термометрия. При температуре выше 37 °С прививки не проводят.

Лицам, отобранным в соответствии с инструкцией по применению препарата, вводят прививочную дозу вакцины.

Участник исследования должен находиться под тщательным наблюдением в течение двух часов после введения исследуемого препарата для выявления возможного развития любых нежелательных явлений (НЯ) немедленного типа. Наблюдение за состоянием здоровья добровольца осуществляет врач (терапевт, педиатр, инфекционист) в течение 5 суток или до исследования, при этом каждый случай развития НЯ должен быть зарегистрирован. При необходимости в каждом случае развития НЯ выполняются дополнительные исследования. Учет общих реакций врач проводит на основании измерения температуры тела, осмотра и опроса привитого.

ЖГВ обычно вводится интраназально и после этого происходит репродукция вакцинных штаммов в слизистых оболочках верхних дыхательных путей, преимущественно в слизистых оболочках носоглотки. Репликация вирусов, входящих в состав ЖГВ, в дыхательных путях вызывает у некоторых лиц появление слабых симптомов заболевания верхних дыхательных путей, а иногда и системную реакцию, но это происходит гораздо реже и переносится не так тяжело, как в случае заражения дикими типами вируса гриппа. Необходимо помнить, что, несмотря на положительные результаты доклинических исследований, существует вероятность развития неблагоприятных воспалительных или аллергических реакций. Например, если в новой вакцине аттенуированный фенотип вакцинного штамма не полностью сохранен, то при его введении человеку возможно развитие пневмонии, синуситов, а также присоединение бактериальных инфекций. Поэтому лица, включенные в исследование, должны находиться под тщательным наблюдением квалифицированного медицинского персонала и при необходимости, участникам исследования должна быть незамедлительно оказана неотложная помощь в течение всего периода их пребывания в клинике. В случае оказания дополнительной неотложной помощи или привлечения дополнительных ресурсов, участник исследования должен быть переведен в соответствующее лечебное учреждение, которое будет определено исследователем заблаговременно до начала исследования.

Для тщательного отслеживания симптомов ОРВИ ежедневно измеряют температуру тела и регистрируют общие и местные реакции. Полученные данные вносят в протокол контроля реактогенности. В него следует включить такие симптомы, как насморк, чувство сухости в носу, першение в горле, кашель, гиперемия зева. В протоколе отмечают также все необычные реакции, в том числе аллергического характера, выявленные в течение периода наблюдения.

Общая реакция может наблюдаться у части привитых и выражаться в недомогании и подъеме температуры; могут развиваться легкие катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей.

Наличие температуры до 37,5 °С включительно расценивают как слабую реакцию, от 37,6 до 38,5 °С включительно – как среднюю, от 38,6 °С и выше – как сильную. Длительность любых температурных реакций и катаральных явлений, связанных с вакцинацией, не должна превышать 3-4 суток. При возникновении реакции наблюдение за привитыми продолжают до ее исчезновения.

Лиц контрольной группы наблюдают в те же сроки с соблюдением тех же требований, что и группы привитых. Показатель реактогенности вакцины вычисляют по сопоставлению частоты температурных реакций у привитых и в контрольной группе.

Вакцину считают реактогенной, если средние или сильные местные реакции или катаральные явления длительностью более 3 суток будут зарегистрированы более, чем у одного из 50 привитых [2].

### **Лабораторно-инструментальное обследование волонтеров, участвующих в клиническом исследовании**

При изучении новых ЖГВ необходимо проведение исследований:

- клинический анализ крови с развернутой гемоцитогаммой, включая определение тромбоцитов;
- общий анализ мочи;
- биохимические исследования сыворотки крови: определение глюкозы, мочевины (остаточного азота), билирубина, АЛТ, АСТ, ЛДГ, щелочной фосфатазы (все возраста), протромбина (протромбинового индекса), холестерина, В-липопротеинов (у взрослых);
- измерение артериального давления (с трех лет); снятие ЭКГ, ЭХО-КГ (все возраста).

Необходимость проведения дополнительных исследований определяется характером и способом введения испытуемого препарата, а также результатами его доклинического изучения. Желательно проведение исследования функции внешнего дыхания (с трех лет).

Первое лабораторно-инструментальное и клиническое обследование волонтеров проводят до вакцинации (за 1-3 суток). Повторные клинико-лабораторные исследования следует осуществить в сроки, равные максимальному инкубационному периоду естественной инфекции. Исследование иммуногенности проводится в период максимальной иммунной реакции на вакцину (обычно на 21-28 день после однократной вакцинации и дополнительно на 42-56 день при двукратной вакцинации). Следует обращать внимание на отсутствие симптомов, свидетельствующих о нейротоксичности вакцины.

В случае, если у привитого какой-либо из определяемых показателей будет выходить за пределы нормальных величин, исследование повторяют через 6 -7 суток, а данный волонтер отводится от последующих прививок испытуемым препаратом.

### **Вирусологическое обследование волонтеров**

Важным аспектом вирусологического обследования является изучение интенсивности и длительности выделения от привитых живой вакциной вирусов (реизолятов), а если возможно, проведено сравнение этих данных с частотой выделения соответствующих вирулентных вирусов гриппа дикого типа у больных. Необходимо, чтобы аттенуация вакцинных штаммов сохранялась и у реизолированных вирусов. Для этого у всех выделенных реизолятов изучаются генотипические и фенотипические характеристики.

Для решения этих задач в назальных и конъюнктивальных (в случае реакции со стороны конъюнктивы) мазках проводят определение вируса методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени или по результатам выделения вируса в куриных эмбрионах или в культуре клеток в различные контрольные сроки после вакцинации.

При возможной передаче вакцинных штаммов от вакцинированных к контактным людям могут возникать изменения в структуре штаммов, поэтому для определения инфекционности и стабильности выделенных от волонтеров изолятов следует проводить их секвенирование.

### **Расширенная оценка безвредности**

Дальнейшие клинические испытания (фаза III и IV) призваны уточнить тип, частоту и тяжесть всех нозологических форм заболеваний, зарегистрированных у привитых, по сравнению с группой плацебо. Определяя продолжительность периода наблюдений при испытании безвредности, следует иметь в виду, что побочные эффекты могут проявиться через длительный срок после вакцинации, поэтому необходимо следить за состоянием испытуемых, по меньшей мере, в течение шести месяцев после завершения прививок, занося в протокол как ближайшие, так и отдаленные во времени эффекты.

### **Изучение иммуногенности**

Клинические испытания должны выявить защитные реакции со стороны иммунной системы, которые можно было бы использовать для лицензирования ЖГВ. Поскольку наиболее вероятный способ введения ЖГВ – интраназальный, ожидается, что иммунологические показатели, указывающие на степень защищенности от гриппозной инфекции после вакцинации иные, нежели нарастание содержания антител в крови, как это показано при испытаниях инактивированных гриппозных вакцин. В результате многочисленных клинических испытаний ЖГВ в различных странах показано полное отсутствие корреляции между ответом гемагглютинирующих антител и уровнем эффективности [12]. Поэтому оценка иммунного ответа должна проводиться после введения каждой дозы исследуемых препаратов по совокупности специфических иммунных маркеров, которые характеризуют реальную защиту.

Наиболее изученный механизм иммунной защиты человека – действие антител против гемагглютининов в крови. Многочисленные исследования показали, что ЖГВ, введенная интраназально, активирует не только гуморальный иммунитет, но и местный иммунный ответ, включая интерферон и прочие цитокины, равно как и адаптивный иммунный ответ, такой как секреторные иммуноглобулины слизистой оболочки, например IgA [17].

Клеточные иммунные механизмы известны хуже и меньше изучены на людях в момент их заражения вирусами гриппа; однако в последние годы показано, что ЖГВ может вызывать ответ Т-клеток, отмеченный у людей, перенесших гриппозную инфекцию. Оценка гуморальных, секреторных и клеточных иммунных механизмов может помочь при дальнейшем объяснении эффективности защиты ЖГВ [16].

В настоящее время минимальным набором реакций для определения иммунного ответа на введение противогриппозной вакцины являются следующие показатели [2]:

- содержание сывороточных антител по данным РТГА;
- содержание сывороточных нейтрализующих антител по данным реакции микронейтрализации;
- содержание сывороточных IgA (иммуноглобулины класса А) или IgG (иммуноглобулины класса G) антител по данным ИФА;
- содержание мукозальных IgA антител по данным ИФА.

Желательно проведение оценки клеточного иммунного ответа по результатам анализа мононуклеарных клеток периферической крови методом проточной цитометрии и/или методом ELISpot .

Иммунологические исследования должны проводиться по стандартным методам, рекомендованными ВОЗ.

Главным критерием оценки вакцин при регистрации новых живых гриппозных вакцин из сезонных вирусов является оценка профилактической эффективности.

### **Оценка профилактической эффективности**

Эффективность ЖГВ должна быть подтверждена в ходе достаточно обширных и хорошо контролируемых эпидемиологических испытаний (Фаза III). Вакцинацию необходимо закончить за месяц до начала сезонного подъема заболеваемости ОРЗ. Сбор данных о заболеваниях среди наблюдаемых контингентов следует проводить после окончания иммунизации. При этом оценка эффективности осуществляется по заболеваемости гриппом и ОРЗ в течение 6-8 месяцев, исключая первый месяц после иммунизации.

Для расчета эффективности вакцины используются следующие методы:

1. Сравнение показателей заболеваемости всеми ОРЗ в период эпидемии гриппа в группе вакцинированных, по сравнению с заболеваемостью в контрольной группе.
2. Расчет эффективности с учетом суммарного результата вирусологической и серологической диагностики гриппа у заболевших ОРЗ (в группе вакцинированных по сравнению с аналогичными данными в контрольной группе).

При использовании этих двух методов вычисляются коэффициенты эффективности (КЭ), которые рассчитываются по формуле:

$$КЭ = \left( 1 - \frac{\text{показатель заболеваемости среди вакцинированных}}{\text{показатель заболеваемости в группе плацебо}} \right) \times 100.$$

Численный состав основной и контрольной групп определяется частотой распространения инфекции и предполагаемого соотношения заболеваемости в обеих группах и рассчитывается по специальной программе (PC – Power and Sample Size Calculation) [15].

Интенсивность гриппозных вспышек меняется год от года, в зависимости от того, какой подтип вируса господствует в период исследования, поэтому могут потребоваться повторные испытания эпидемиологической эффективности в последующие несколько лет. Программа оценки профилактической эффективности ЖГВ должна быть согласована с регулирующими органами.

### **Постмаркетинговые исследования**

В ходе постмаркетинговых исследований может быть получена важная информация о безопасности и эффективности ЖГВ, которая не могла быть известна до получения лицензии. Постмаркетинговые исследования помогают лучше изучить безопасность и эффективность ЖГВ в ситуациях, которые нельзя было предвидеть, особенно это касается редких неблагоприятных воздействий.

Что касается дальнейших исследований новых типов ЖГВ, то после того, как накоплен достаточный опыт работы с различными вирусными вакцинами, относящимися к одному типу, согласно рекомендациям ВОЗ, проведение дальнейших постмаркетинговых исследований может перестать быть оправданным.

### **Оценка ЖГВ для особых групп населения**

#### *Вакцины для детей*

Исследования на детях могут проводиться для оценки безопасности и эффективности новой ЖГВ только в том случае, если клинические испытания на взрослых показали ее безопасность и хорошую переносимость. Принцип испытаний заключается в том, что сначала проводятся испытания на старших детях (14 лет и старше), после получения положительных результатов, целесообразно переходить к группам младшего возраста (7-13 лет, затем 3-6 лет, при необходимости, после этого переходят на группу более младшего возраста). Данное требование вызвано тем, что дети младшего возраста более склонны к проявлению локальных и системных негативных симптомов, которые не наблюдаются у старших детей, ранее имевших контакт с гриппом.

### *Вакцины для людей старшего возраста и лиц, страдающих хроническими заболеваниями*

Испытания на людях старшего возраста, особенно страдающих хроническими заболеваниями, могут проводиться для оценки безопасности и эффективности новой ЖГВ только в том случае, если клинические испытания на взрослых показали, что вакцина стабильно безопасна для здоровых людей. Существуют заметные различия между здоровыми взрослыми и пожилыми людьми, связанные с неоднократными заболеваниями гриппом у последних, а также хроническими заболеваниями, в частности, сердечно-сосудистой и дыхательных систем у лиц преклонного возраста.

Следует рассмотреть возможность проведения особых исследований для людей, страдающих бронхитом, астмой и другими хроническими заболеваниями. Для них вакцинация против гриппа имеет особое значение, т.к. течение болезни может быть особенно тяжелым.

### **Изменения штаммов в лицензированной сезонной вакцине**

Поскольку дикie типы вируса гриппа постоянно меняются, необходимо изменять (в соответствии с ежегодными рекомендациями ВОЗ на предстоящий эпидемический сезон) состав штаммов ЖГВ. Замена штаммов происходит не только в составе живых, но и инактивированных вакцин. Как правило, если методология подготовки штаммов и технология производства вакцины остается прежней, можно предполагать, что после замены вакцинных штаммов, биологические характеристики которых соответствуют аналогичным характеристикам используемых ранее вакцинных штаммов, оценка соотношения риска и пользы, останется прежней.

Если проводятся широкие кампании по массовой вакцинации населения, можно рекомендовать проведение контроля качества ЖГВ в предстоящем году и дополнить его годовой программой постмаркетингового наблюдения. Программа постмаркетингового наблюдения по мере накопления опыта может меняться. На следующий год после лицензирования можно провести постмаркетинговые исследования, которые в дальнейшем могут быть заменены постоянной программой наблюдения. В любом случае, держателям регистрационного удостоверения рекомендуется согласовать с государственными регулирующими органами подробности программы постмаркетингового наблюдения.

### **Вакцина против пандемического гриппа**

В случае, если при пандемии планируется использовать новую ЖГВ, она должна в максимальной степени соответствовать указанным выше требованиям, предъявляемым к производству и контролю новых ЖГВ, и, кроме того, учитывать специальные нормативные требования, предъявляемые к вакцинам против пандемического гриппа [13, 19, 20, 22].

Испытания новых ЖГВ, содержащих пандемически опасные вирусы гриппа, должны проводиться в изолированных помещениях до тех пор, пока не будет доказано, что вакцинированные люди не распространяют вакцинный штамм и высокопатогенный новый вирус не распространяется среди людей.

Так как основная масса населения не имеет защиты к пандемическим вирусам, подготовленная из них вакцина вероятнее всего будет вводиться двукратно.

В случае возникновения пандемии вакцина должна быть изготовлена в наиболее сжатые сроки для скорейшего начала массовой вакцинации населения.

Учитывая данные обстоятельства, рекомендуется проведение только I и II фаз клинических испытаний на контингенте лиц, для которых она рекомендуется.

При регистрации пандемических вакцин должны быть представлены результаты изучения безвредности и иммуногенности препарата.

Подробные рекомендации, относящиеся к противогриппозным вакцинам (человеческие, живые аттенуированные), предназначены для использования в качестве вакцин против пандемии, содержатся в Рекомендациях ВОЗ по нормативно-правовой готовности вакцины человеческой против пандемического гриппа [13, 14, 18, 19].



## Литература

1. Методические указания МУ 3.3.1.1095-02 «Медицинские противопоказания к проведению профилактических прививок препаратами национального календаря прививок» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ от 9 января 2002 г.).
2. Методические указания МУ 3.3.2.1758-03 «Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа» (утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 28.09.2003).
3. Модельный закон о защите прав и достоинств человека в биомедицинских исследованиях в государствах – участниках СНГ (принят в г. Санкт-Петербурге на 26-м пленарном заседании МПА СНГ – постановление от 18.11.2005 № 26-10).
4. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика».
5. Приказ Минздравсоцразвития России №774н от 31.08.2010 «О Совете по этике».
6. Приказ Минздравсоцразвития России от 26.08.2010 № 750н «Об утверждении правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и формы заключения комиссии экспертов».
7. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 156/29 от 07.05.1998 «О подготовке новых вакцинных производственных и диагностических штаммов вируса гриппа и их внедрение в производство вакцин и диагностических препаратов».
8. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2.1248-03 «Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов», утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 18.02.2008 № 9.
9. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2.1288-03 «Надлежащая практика производства иммунобиологических лекарственных препаратов», утвержденные Главным государственным санитарным врачом РФ 17.04.2003.
10. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2342-08 «Обеспечение безопасности иммунизации», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 03.03.2008 № 15.
11. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61 ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
12. Bandell A. Woo J., Coelingh K. Protective efficacy of live attenuated influenza vaccine (multivalent, Ann Arbor strain): a literature review addressing interference // Expert Rev. Vaccines 10(8), 1131-1141 (2011).
13. Global pandemic influenza action plan to increase vaccine supply: progress report 2008. In WHO Immunization, Vaccines and Biologicals. Geneva, World Health Organization, 2009. [http://www.who.int/vaccine\\_research/Global\\_Pandemic\\_Influenza.pdf](http://www.who.int/vaccine_research/Global_Pandemic_Influenza.pdf)
14. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Meeting summary for HHS workshop on pandemic influenza vaccines. “Development of a Clinical Trial Plan for Pandemic Influenza Vaccines.” <http://www.niaid.nih.gov/about/organization/dmid/Documents/pansummary.pdf> NIAID website, accessed 08 July 2011.
15. PC – Power and Sample Size Calculation <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/wiki/Main/PowerSampleSize>
16. Petukhova G. Naikhin A. Chirkova T. Donina S. Korenkov D. and Rudenko L. Comparative studies of local antibody and cellular immune responses to influenza infection and vaccination with live attenuated reassortant influenza vaccine (LAIV) utilising a mouse nasal-associated lymphoid tissue (NALT) separation method. Vaccine. 2009;27:2580–2587.
17. Points to consider on the development of live attenuated influenza vaccines (CPMP). EMEA, 2003. <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/bwp/228901en.pdf>
18. Regulatory Preparedness for Human Pandemic Influenza Vaccines. In WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva, World Health Organization, 2007. [http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/Human\\_pandemic\\_Influenza\\_Vaccines\\_BS2074\\_01Feb08.pdf](http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/Human_pandemic_Influenza_Vaccines_BS2074_01Feb08.pdf)
19. WHO biosafety risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines (WHO Technical Report Series No 941, 2007. Annex 5.) <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/Annex%205%20human%20pandemic%20influenza.pdf>
20. WHO Department of Communicable Disease. WHO global influenza preparedness plan: the role of WHO and recommendations for national measures before and during pandemics. Geneva, World

- Health Organization, 2005. [http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\\_CDS\\_CSR\\_GIP\\_2005\\_5.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_5.pdf)
21. WHO Guidelines for good clinical practices (GCP) for trial on pharmaceutical products. World Health Organization Expert Committee on the use of essential drugs, Sixth report., 1995 Annex 3. (WHO Technical Report Series, No. 850) [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_850.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_850.pdf)
  22. WHO Immunization, Vaccines and Biologicals. Global action pandemic influenza action plan to increase vaccine supply. Geneva, World Health Organization, 2006. [http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO\\_IVB\\_06.13\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_IVB_06.13_eng.pdf)
  23. WHO Technical Report, Series No. 924, 2004. Annex 1. Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations [http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/clinical\\_evaluation/035-101.pdf](http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/clinical_evaluation/035-101.pdf)

## ГЛАВА 7

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИЧ/СПИД

#### 7.1. ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ АНТИ-ВИЧ-ВАКЦИН

*СОСТАВИТЕЛИ: акад. РАМН Р.М. Хаитов, д. б. н. Г.О. Гудима, д. б. н., проф. Э.В. Карамов, д. м. н., проф. И.Г. Сидорович, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России*

Анти-ВИЧ-вакцины представляют собой самостоятельный класс вакцинных препаратов и имеют ряд особенностей. Для создания вакцины против ВИЧ оказались неприменимы традиционные, «пастеровские», методы разработки вакцин. ВИЧ обладает высоким уровнем изменчивости и способен уходить от действия иммунного ответа. Достоверно не подтверждено случаев выздоровления от ВИЧ-инфекции (за счет собственной иммунной системы или в результате медикаментозного лечения), соответственно нет «природной модели», которая позволила бы понять механизм иммунной защиты против ВИЧ. И, наконец, мишенью ВИЧ являются клетки иммунной системы, которые и должны участвовать в обеспечении индуцированного вакциной протективного иммунного ответа. Таким образом, анти-ВИЧ-вакцина должна представлять собой принципиально новый препарат, а для создания ее необходимы принципиально новые подходы. Преодоление этих трудностей требует фундаментальных научных исследований, в процессе которых сформировалась новая область вакцинологии [2].

Так как нет инфекционных заболеваний, которые можно было бы искоренить или эффективно контролировать в глобальном масштабе без применения вакцин, осуществление успешной программы создания и применения вакцины против ВИЧ-инфекции/СПИДа является критическим в условиях расширения эпидемии [3, 4]. При этом значительные усилия необходимо приложить не только в научной области, но и в отношении этических и правовых аспектов, связанных с испытаниями анти-ВИЧ/СПИД-вакцин, а в будущем – их распространением и распределением.

Клинические испытания анти-ВИЧ-вакцин имеют двойственный характер: с одной стороны, это регламентированное испытание вакцинных препаратов с участием добровольцев, а с другой – научное исследование, которое позволяет получить новые данные о биологии и иммунологии ВИЧ, патогенезе ВИЧ-инфекции/СПИДа, а также дает возможность отработать схемы иммунизации и провести необходимую корректировку препарата. Клинические испытания являются неотъемлемым компонентом научных исследований по созданию анти-ВИЧ-вакцин, так в них получают важную информацию, необходимую для понимания основ протективного иммунитета [5, 6]. При этом организация клинических испытаний анти-ВИЧ-вакцин, в частности, формирование когорт добровольцев, имеет дополнительные особенности и трудности по сравнению с испытаниями других вакцинных препаратов [7, 8].

Клинические испытания анти-ВИЧ-вакцин в Российской Федерации начались относительно недавно – в 2004 году. Первой в клинические испытания в нашей стране была включена анти-ВИЧ-вакцина (разработка «ГНЦ «Институт иммунологии»

ФМБА России). Ее клинические испытания успешно продолжаются в настоящее время. Также в России начались клинические испытания и других кандидатных анти-ВИЧ-вакцин.

В настоящем разделе будут рассмотрены особенности организации клинических испытаний анти-ВИЧ-вакцин, подходы к формированию когорт добровольцев, специфика методического обеспечения клинических испытаний.

*Критерии включения/исключения добровольцев для участия в клинических испытаниях профилактических анти-ВИЧ-вакцин [4]*

Критерии включения	Критерии исключения
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Граждане (жители) Российской Федерации.</li> <li>2. Возраст: от 20 до 50 лет.</li> <li>3. Для женщин потребуются отрицательный результат теста на беременность по моче и письменное согласие на применение мер контрацепции.</li> <li>4. Отсутствие выраженных соматических заболеваний или декомпенсированных хронических заболеваний.</li> <li>5. Клинико-лабораторные показатели в следующих границах: <ul style="list-style-type: none"> <li>• лейкоциты: от 4 000 до 10 800 кл/мм<sup>3</sup> ;</li> <li>• тромбоциты: от 150 000 до 400 000 на мм<sup>3</sup>.</li> </ul> </li> <li>6. Результат анализа мочи на белок и кровь: отрицательный или следы.</li> <li>7. Отрицательный результат серологического теста на ВИЧ-инфекцию (ИФА).</li> <li>8. Возможность участия в клинических испытаниях в течение срока, определенного протоколом.</li> <li>9. Успешное выполнение теста на понимание целей и задач исследования, желание участвовать в испытаниях, подписание участником формы «Информированного согласия», одобренной соответствующими инстанциями.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Позитивный результат серологического теста на ВИЧ-инфекцию (ИФА).</li> <li>2. Первичные иммунодефициты, хронические заболевания в стадии декомпенсации, аутоиммунные и атопические заболевания.</li> <li>3. Применение иммуносупрессивной терапии или противоопухолевой химиотерапии.</li> <li>4. Данные о психиатрических и медицинских проблемах и/или злоупотреблении алкоголем, наркотиками и др., которые, по мнению исследователя, могут оказать нежелательное воздействие на возможность добровольца участвовать в клинических испытаниях.</li> <li>5. Наличие связанных с родом деятельности или иных обязанностей, способных помешать завершению участия в клинических испытаниях.</li> <li>6. Прививка любой живой аттенуированной вакциной в течение 60 дней до начала клинических испытаний.</li> <li>7. Применение экспериментальных терапевтических препаратов не менее чем за 30 дней до начала участия в клинических испытаниях.</li> <li>8. Переливание крови, ее компонентов или иммуноглобулинов за последние 3 месяца до начала клинических испытаний.</li> <li>9. Наличие в анамнезе анафилаксии или любых нежелательных реакций на вакцины, гиперчувствительности немедленного типа.</li> <li>10. Физиологические состояния: беременность, лактация.</li> <li>11. Примечание: женщины детородного возраста должны использовать эффективные противозачаточные средства до первой иммунизации и, по крайней мере, 3 месяца после последней иммунизации.</li> <li>12. Сотрудники исследовательского учреждения, проводящего испытания, привлеченные к выполнению протокола клинических испытаний, которые могут иметь прямой доступ к результатам по иммуногенности.</li> </ol>

Перед включением в клинические испытания участники проходят медицинское обследование. Анти-ВИЧ-вакцины рассматриваются в первую очередь как профилактические препараты, и для участия в их клинических испытаниях необходимо привлечение ВИЧ-неинфицированных здоровых добровольцев.

Ряд кандидатных вакцин против ВИЧ могут рассматриваться как потенциально лечебные препараты. С этой целью привлекаются ВИЧ-инфицированные добровольцы [4, 13]. В этом случае при формировании когорты добровольцев следует применять особые критерии включения/исключения.

*Условия участия ВИЧ-инфицированных добровольцев в клинических испытаниях терапевтических анти-ВИЧ-вакцин [4]*

Состояние иммунной системы*	Иммунная система функциональна или есть возможность ее восстановить за счет иммуностимулирующего компонента вакцины
Количество CD4 <sup>+</sup> -Т-клеток	300-350 кл/мкл и более
Уровень вирусной нагрузки	Низкий (< 50 копий РНК ВИЧ / мл)
Прием антиретровирусных препаратов	Возможен
Последовательность лечения и вакцинации	Вначале с помощью антиретровирусных препаратов добиваются снижения вирусной нагрузки. Незадолго до прерывания приема препаратов вводится вакцина. Когда уровень вирусной нагрузки становится стабильно низким, прерывают прием АРТ

\* Реципиенты терапевтической вакцины должны быть способны при вакцинации развить сильный иммунный ответ, эффективный против ВИЧ. У пациентов с ослабленной иммунной системой может не развиться достаточного сильного иммунного ответа на ответ на терапевтическую анти-ВИЧ-вакцину, если в ее составе нет иммуностимулятора (адьюванта).

**В протоколе клинических испытаний анти-ВИЧ-вакцин необходимо:**

Научно обосновать выбор группы добровольцев для привлечения к участию в исследовании.

Определить, какими потенциальными преимуществами может быть компенсирован риск, взятый на себя участниками исследования.

Показать, какую пользу могут получить добровольцы, участвующие в исследовании кандидатной вакцины.

Установить меры предосторожности для защиты участников исследования от возможного риска, связанного с участием в данном исследовании, в том числе и социального.

Кроме общепринятых положений в протоколе исследования помимо научной обоснованности необходимо обратить особое внимание на то, что ожидаемые результаты должны быть потенциально полезными для добровольцев.

Обоснованными научными вопросами, важными для разработки анти-ВИЧ-вакцины, следует считать те, ответы на которые позволят:

- получить научную информацию по вопросам безопасности, иммуногенности (способности вызывать иммунный ответ на антигены ВИЧ) и эффективности (степени защиты от ВИЧ-инфекции или замедления развития СПИДа) исследуемой кандидатной вакцины;
- определить иммунологические корреляты и суррогатные показатели для выявления механизмов иммунной защиты против ВИЧ-инфекции, а также способы активации соответствующих молекулярных и клеточных механизмов;
- провести сравнительную оценку различных кандидатных вакцин;
- изучить, будут ли вакцины, эффективные в одной группе населения, эффективны и в других группах.

## **Информированное согласие**

Информированное согласие представляет собой процесс изучения потенциальным участником клинических испытаний ключевых сведений о клиническом исследовании, на основании чего добровольцем принимается решение об участии в исследовании или отказе от него. Это также непрерывный процесс постоянного информирования участника во время исследования. Необходимо обеспечить информирование и консультирование участников испытаний в доступной для понимания форме. Потенциальному участнику исследования предоставляется документ «Информированное согласие», в котором изложены все детали исследования, в том числе описание прав участников, цели исследования, его продолжительность, риск и потенциальная польза, планируемые процедуры и манипуляции, контактная информация.

В случае клинических испытаний анти-ВИЧ/СПИД-вакцин следует обратить особое внимание на разъяснение потенциальному добровольцу в доступной форме вопросов, связанных с безопасностью кандидатной вакцины, невозможностью получить ВИЧ-инфекцию через вакцинацию, возможное появление ВИЧ-сероположительности и временный характер этого явления, а также способы дифференциальной диагностики ВИЧ-сероположительности, обусловленной иммунным ответом на вакцину, и сероположительностью, вызванной ВИЧ-инфекцией.

Ошибочное представление о приобретении иммунной защиты в результате вакцинации может стимулировать у участников испытаний формы поведения, связанные с риском ВИЧ-инфекции. В связи с этим при консультировании добровольцев важно подчеркнуть, что эффективность исследуемой вакцины еще не доказана, поэтому не следует считать вакцинацию экспериментальной вакциной защитой от ВИЧ-инфекции и необходимо соблюдать все меры предотвращения ВИЧ-инфекции, в том числе касающиеся ограничения рискованного поведения.

## **Польза и риски участия в клинических испытаниях**

### ***Польза***

Участники клинических испытаний (особенно те, которые принадлежат к группе риска ВИЧ-инфекции) могут получить доступ к экспериментальным препаратам для предотвращения ВИЧ-инфекции до того, как они станут широко распространенными, а также помочь другим людям, внося вклад в медицинские исследования. Так как многие кандидатные анти-ВИЧ-вакцины могут рассматриваться не только как профилактические, но и как потенциальные лечебные (терапевтические) препараты, участие ВИЧ-неинфицированных добровольцев в их клинических испытаниях вносит вклад в помощь и здоровым и ВИЧ-инфицированным людям. К числу преимуществ относится получение во время клинических испытаний высококвалифицированного бесплатного медицинского обследования (а при необходимости – медицинской помощи) с применением самых передовых технологий.

Дополнительными преимуществами для участников клинических испытаний анти-ВИЧ-вакцин являются:

- получение всеобъемлющей информации по вопросам передачи ВИЧ-инфекции и способов ее предотвращения;
- получение вознаграждения за участие в клинических испытаниях;
- возможность приобретения защитного иммунитета против ВИЧ, если кандидатная вакцина окажется эффективной. Это преимущество является пока весьма спорным, так как до настоящего времени ни один кандидатный вакцинный препарат против ВИЧ-инфекции еще не разрешен к медицинскому применению. Ошибочное представление о приобретении иммунной защиты в результате вакцинации может стимулировать у участников испытаний поведение, связанное с риском ВИЧ-инфекции. Соответственно, необходимо проводить постоянное консультирование участников клинических испытаний по вопросам предотвращения ВИЧ-инфекции.

## **Риски**

К числу рисков участия в клинических исследованиях можно отнести:

- возможность неприятных, серьезных и даже угрожающих жизни побочных эффектов и неблагоприятных явлений при применении исследуемого лекарственного препарата (в том числе и вакцины) или метода лечения;
- исследуемый препарат или способ лечения может оказаться неэффективным для добровольца;
- выполнение протокола может потребовать от добровольца затрат дополнительного времени, не включенного в протокол клинических испытаний, связанного с поездками к месту проведения испытаний, госпитализацией и др.

*Побочные эффекты* – это любые нежелательные проявления или эффекты исследуемого лекарственного препарата или лечения. К негативным или неблагоприятным явлениям могут быть отнесены головная боль, тошнота, выпадение волос, раздражение кожи или другие медицинские проблемы. Необходимо оценить как немедленные, так и долгосрочные побочные эффекты экспериментального лечения и представить эту информацию в протоколе исследования.

Возможные побочные реакции на кандидатную вакцину, а также повреждения, которые могут быть связаны с процессом исследования, должны быть описаны в протоколе исследования и полностью разъяснены потенциальным участникам исследования в процессе получения информированного согласия. И в протоколе, и в процессе получения информированного согласия следует описать характер предоставляемой медицинской помощи, компенсации за причиненный в ходе исследований вред и порядок принятия решения о компенсации [9, 12].

Участие в исследованиях по созданию анти-ВИЧ/СПИД-вакцины может нанести участникам клинических испытаний потенциальный вред физиологического, психологического и социального характера. Возможный физиологический вред может быть связан с взаимодействием кандидатной вакцины с иммунной системой человека. Целью вакцинации является выработка иммунной реакции, направленной на предотвращение проникновения вируса в организм или на ограничение ВИЧ-инфекции. Анти-ВИЧ/СПИД-вакцины, рассматриваемые в качестве кандидатных препаратов для введения человеку, не способны инфицировать человека, так как не содержат ВИЧ или его природные компоненты. Целый ряд кандидатных вакцин в настоящее время уже испытан в лабораторных и клинических исследованиях. До сих пор серьезных побочных явлений не было отмечено [4]. Тем не менее, при испытаниях кандидатных вакцин следует предполагать возможность следующих побочных явлений:

- участник исследования, которому ввели кандидатную вакцину, может оказаться более восприимчивым в отношении ВИЧ-инфекции, либо возможна вероятность более быстрого прогрессирования заболевания в случае инфицирования, по сравнению с невакцинированным лицом [14, 15];
- возможно, потребуются повторное (многократное) инъекционное введение вакцины в течение нескольких месяцев или лет, что может сопровождаться появлением боли, кожными реакциями и другими биологическими проявлениями (например, лихорадка или недомогание);
- во время проведения испытаний участники могут получить повреждения, связанные с исследовательским процессом (например, в связи с забором крови из вены при обследовании).

Важным аспектом являются потенциальные социальные риски. Став общественным достоянием, факт участия в клинических испытаниях может вызвать стигматизацию и дискриминацию, так как участника могут считать ВИЧ-инфицированным. Кроме того, у некоторых добровольцев в результате вакцинации может регистрироваться положительный результат тестирования на ВИЧ (ВИЧ-сероположительность), в то время как они в действительности не инфицированы ВИЧ. Это может привести к таким же неблаго-

приятным социальным последствиям, которые возникают в отношении действительно инфицированных людей.

В Протоколе исследования должны быть отражены возможная польза и потенциальные риски, а также гарантировано соблюдение конфиденциальности, анонимности и обеспечение доступной психосоциальной (консультирование) и правовой помощи. При планировании и проведении клинических испытаний анти-ВИЧ-вакцин необходимо обеспечить применение лабораторных методик, позволяющих отличать ложную ВИЧ-сероположительность, вызванную вакцинацией, и положительные результаты тестирования, обусловленные настоящей ВИЧ-инфекцией (дифференциальная диагностика).

**ВИЧ-инфекцию, выявленную в период участия в клинических испытаниях кандидатной анти-ВИЧ/СПИД-вакцины, не следует рассматривать в качестве предмета для компенсации, если только не установлена причинно-следственная связь между вакциной и ВИЧ-инфицированием или не установлен факт инфицирования в результате проведения манипуляций, связанных с исследованием [11].**

### **Группа сравнения (контрольная группа)**

Группа сравнения служит стандартом для оценки экспериментальных наблюдений. Во многих клинических исследованиях группа пациентов получает экспериментальное лечение или препарат, а группа сравнения – стандартное лечение или плацебо. Плацебо – это неактивный аналог лекарственной формы (таблетка, жидкость или порошок), который не обладает лечебными свойствами.

**До тех пор, пока не будет создана эффективная вакцина против ВИЧ, метод клинических исследования с использованием плацебо-контроля следует считать этически приемлемым для III фазы клинических испытаний кандидатной вакцины (оценка эффективности).** В будущем участники III фазы клинических испытаний анти-ВИЧ/СПИД-вакцин, составляющие группу сравнения, должны будут получать вакцину против ВИЧ, доказавшую свою эффективность и безопасность. Пока же такая вакцина отсутствует. Кроме того, применение метода плацебо-контроля можно считать научно обоснованным, если:

- вакцина, эффективная против одного штамма ВИЧ, не считается эффективной против другого штамма, доминирующего в исследуемом сообществе или регионе;
- имеются серьезные основания считать, что биологические факторы первоначальных испытаний эффективности настолько отличались от таковых в предлагаемой для исследования группе, что эти результаты не могут быть непосредственно перенесены на изучаемую группу населения.

### **Защита безопасности участников клинических испытаний**

Этические и правовые нормы, которые регламентируют медицинскую деятельность, также применяются к клиническим исследованиям [9, 12]. Кроме этого, проведение клинических испытаний регулируется федеральным законодательством с целью обеспечения правовой защиты участников исследования. В протоколе клинических испытаний детально описываются права добровольцев и все действия исследователей. По мере выполнения исследования предоставляются отчеты в контролирующие государственные органы. Имена и другая персональная информация об участниках исследования является конфиденциальной и не подлежит разглашению. Конфиденциальными считаются любые данные, которые позволяют идентифицировать участника испытаний, и персональная медицинская информация. До начала исследования должно быть подтверждено соблюдение конфиденциальности участников испытаний и получено разрешение на использование результатов исследования в научных целях без персональной идентификации.

Важно отметить, что Национальный стандарт Надлежащих клинических исследований, принятый в Российской Федерации [9, 12] предусматривает обязательное страхование участников клинических испытаний за счет организации, проводящей исследование.



Страхование участников клинических испытаний осуществляется на основании отдельно оформляемого договора и не вступает в конфликт с иными видами страхового обеспечения добровольца, в том числе и медицинского. Подобное требование не предусмотрено в нормативных документах, регламентирующих клинические испытания в США (FDA) и странах Евросоюза (ЕМЕА).

### **Фазы клинических испытаний**

Аналогично испытаниям вакцинных препаратов против других инфекционных заболеваний, клинические испытания анти-ВИЧ-вакцин проводятся в несколько этапов, или фаз [9, 16, 17]. На каждой фазе клинические испытания имеют различные цели и задачи.

**I фаза клинических испытаний** проводится с целью определения безопасности и переносимости кандидатных анти-ВИЧ-вакцин, II фаза – определения безопасности, переносимости и иммуногенности, в III фазе – оценивается безопасность, переносимость, иммуногенность и эффективность исследуемой кандидатной анти-ВИЧ-вакцины. IV фаза – пострегистрационные исследования – в отношении анти-ВИЧ/СПИД-вакцин рассматриваются пока в перспективе.

I фаза клинических испытаний – к участию привлекается небольшая группа добровольцев (15-80 человек). В клинических исследованиях I фазы не планируется применение плацебо.

Важная задача клинических испытаний I фазы – определение максимальной дозы, при которой кандидатный вакцинный препарат может быть безопасно применен (без серьезных побочных эффектов), а также принятие решения о наиболее перспективном методе его применения. Обычно первые участники испытаний получают низкую дозу препарата. Их тщательно наблюдают и при отсутствии побочных эффектов или их слабой выраженности следующей группе участников назначают более высокую дозу препарата. Этот процесс продолжается до тех пор, пока не будет определена доза препарата, которая наиболее вероятно обладает специфическим действием при приемлемом уровне побочных эффектов.

В задачу I фазы не входит определение эффективности исследуемой кандидатной анти-ВИЧ-вакцины. В целом, это исследование с наибольшим потенциальным риском и наименьшим выявлением потенциальной пользы. Если в клинических испытаниях I фазы обнаруживается, что исследуемая кандидатная анти-ВИЧ-вакцина достаточно безопасна, она может быть рекомендована для исследования специфического действия (иммуногенности) в клинических испытаниях II фазы.

**II фаза клинических испытаний** – количество добровольцев, привлекаемых к участию в испытаниях в этой фазе, обычно составляет 100-300 человек. Они получают препарат в дозировках, которые определены в клинических испытаниях I фазы как безопасные и потенциально эффективные. Как правило, все участники II фазы клинических исследований получают препарат в одной и той же дозе, применения плацебо не планируется. В дополнение к изучению иммуногенности кандидатной анти-ВИЧ-вакцины, происходит дальнейшее изучение безопасности, и отслеживаются любые побочные эффекты. Так как в клинических испытаниях II фазы принимает участие большее количество добровольцев, увеличивается вероятность выявления каких-либо новых побочных эффектов.

В зависимости от задач, связанных с конкретными клиническими исследованиями, II фазу клинических испытаний иногда подразделяют на фазу IIa и фазу IIb. Клинические испытания фазы IIa специально планируются для определения (или уточнения) дозировки исследуемой кандидатной анти-ВИЧ-вакцины. Клинические испытания фазы IIb планируются для получения информации о потенциальной эффективности исследуемого препарата («проверка концепции») и, соответственно, обоснований для продвижения его в клинические испытания III фазы. В случае планирования клинических исследований фазы IIb количество добровольцев, принимающих участие в них, может быть

значительно увеличено по сравнению со стандартным протоколом клинических испытаний II фазы и составить до 3000 человек. Как правило, в клинических испытаниях фазы IIb предусмотрено применение плацебо и, соответственно, используется рандомизация участников исследования в 2 группы (или более).

Если достоверно подтверждается иммуногенность исследуемой кандидатной вакцины, а побочные эффекты выражены незначительно, препарат может быть рекомендован к исследованию его эффективности в клинических испытаниях III фазы.

**III фаза клинических испытаний** – проводится с целью оценки эффективности исследуемой кандидатной анти-ВИЧ-вакцины, либо (в перспективе) сравнение с эффективностью уже существующего вакцинного препарата. Клинические испытания III фазы требуют привлечения большого количества добровольцев (не менее нескольких сот человек, обычно 1000-3000 человек). Как правило, это мультицентровые исследования, которые проводятся одновременно на базе медицинских центров по всей стране (или даже в нескольких странах). Добровольцы – участники клинических испытаний случайным образом распределяются в 2 группы. Участники одной из них получают экспериментальный препарат, участники другой группы получают плацебо. III фаза клинических испытаний планируется как двойное слепое исследование, то есть ни исследователь, ни доброволец не должны знать исследуемый вакцинный препарат или плацебо, который получает участник исследования. Обычно участники испытаний имеют равные шансы быть распределенными в одну из групп. Однако в некоторых случаях распределение в группы может иметь иное соотношение: например, 2/3 участников получают экспериментальный препарат, а 1/3 – плацебо (или препарат сравнения).

Как и на предыдущих этапах исследования, производится тщательное наблюдение участников испытаний с регистрацией любых побочных эффектов. Если обнаруживаются тяжелые побочные эффекты, испытания могут быть остановлены.

В том случае, если клинические испытания III фазы показали, что новый кандидатный препарат эффективен и безопасен, то он заявляется на разрешение его применения в клинической практике. На основании анализа результатов клинических испытаний соответствующие государственные регулирующие органы принимают решение о том, соответствует ли кандидатная анти-ВИЧ-вакцина критериям разрешения для его широкого применения. Если кандидатная вакцина лицензируется, она может стать новым стандартом медицинской помощи и последующие кандидатные анти-ВИЧ-вакцины будут сравниваться уже с этим препаратом.

#### **IV фаза клинических испытаний (постмаркетинговые)**

Целью IV фазы является получение дополнительной информации о безопасности препарата, пользе и риске его применения, выявление неизвестных ранее и отдаленных побочных эффектов, а также оптимизация способов применения препарата. Для анти-ВИЧ-вакцин клинические испытания IV фазы пока являются лишь перспективными.

Даже после испытания новых медицинских препаратов с участием тысяч добровольцев полный эффект его применения будет изучаться в постмаркетинговых исследованиях. В этой фазе появляется возможность выявления необычных побочных эффектов, а также отдаленных побочных эффектов, что требует проведение многолетних исследований. IV фаза клинических исследований связана с препаратами, которые уже лицензированы и, следовательно, доступны для врачей и пациентов.

#### **Подходы к формированию когорт добровольцев**

Потенциальных добровольцев, привлекаемых к участию в клинических испытаниях кандидатных анти-ВИЧ-вакцин, можно разделить на 2 группы: ВИЧ-неинфицированные и ВИЧ-инфицированные. ВИЧ-неинфицированные (ВИЧ-серонегативные) добровольцы привлекаются для участия в клинических исследованиях профилактических анти-ВИЧ/СПИД-вакцин, ВИЧ-инфицированные – для участия в клинических исследованиях лечебных (терапевтических) анти-ВИЧ/СПИД-вакцин.

Группы (когорты) добровольцев, участвующих в различных фазах клинических испытаний профилактических анти-ВИЧ-вакцин, различаются между собой. К участию в клинических испытаниях I фазы привлекаются здоровые ВИЧ-неинфицированные добровольцы, в основном с низким риском ВИЧ-инфекции. Когорта участников II фазы клинических испытаний может включать ВИЧ-неинфицированных здоровых добровольцев с повышенным риском ВИЧ-инфекции. III фаза клинических испытаний анти-ВИЧ/СПИД-вакцин (оценка эффективности) проводится с участием когорты ВИЧ-серонегативных добровольцев с высоким риском ВИЧ-инфекции.

Понимание добровольцами, участвующими в клинических испытаниях, их роли как участников исследования и их добровольная приверженность к выполнению протокола исследований является столь же важным аспектом, как и оценка безопасности и эффективности кандидатных вакцин. Для испытаний профилактических анти-ВИЧ/СПИД-вакцин это особенно актуально. Необходимо принимать во внимание не прямое стимулирование рискованного поведения и ошибочные ожидания со стороны добровольцев, связанные с надеждой получить иммунную защиту от ВИЧ-инфекции [4, 18-23].

#### **Принципы формирования когорт добровольцев для клинических испытаний кандидатных анти-ВИЧ-вакцин:**

- Добровольность.

- Информированность.

- Конфиденциальность.

- Анонимность.

- Страхование.

- Бесплатное медицинское сопровождение.

- Дифференциальная диагностика ВИЧ-сероположительных результатов.

- Подтверждение участия в клинических испытаниях анти-ВИЧ/СПИД-вакцины.

- Консультирование о предотвращении ВИЧ-инфекции.

- Вознаграждение.

#### **Мотивы участия и отказа от участия в клинических испытаниях анти-ВИЧ-вакцин**

Понимание мотивов, по которым люди принимают участие в клинических испытаниях анти-ВИЧ-вакцин или отказываются от них, является важным аспектом привлечения добровольцев к участию в клинических испытаниях анти-ВИЧ-вакцин [4, 24].

Специально проведенные исследования позволили выявить и систематизировать мотивы участия в клинических испытаниях и обстоятельства, препятствующие участию в клинических испытаниях [4, 24, 25].

В качестве основных мотивов участия добровольцев в клинических испытаниях анти-ВИЧ-вакцин были выявлены:

- Помощь ВИЧ-инфицированным людям, включая лиц из ближайшего окружения.

- Вклад в научные исследования по созданию анти-ВИЧ-вакцин.

- Возможность получить иммунную защиту против ВИЧ-инфекции.

- Бесплатная страховка и медицинское обследование.

Обстоятельства, препятствующие участию в клинических испытаниях анти-ВИЧ-вакцин, распределились по следующим самостоятельным категориям:

- Сомнения в безопасности вакцины и боязнь получить ВИЧ-инфекцию.

- Боязнь побочных эффектов.

- Боязнь получения ложных ВИЧ-серопозитивных результатов, связанных с ними социальным риском.

- Невозможность выполнять протокол испытаний.

- Низкое вознаграждение.

- Необъясненные причины.

**Аспекты безопасности и боязнь социальной дискриминации являются ключевыми причинами, ограничивающими участие в клинических испытаниях профилактических анти-ВИЧ-вакцин.**

Важно отметить, что реальное количество добровольцев, которые дали согласие участвовать в клинических испытаниях анти-ВИЧ/СПИД-вакцин, как правило, значительно ниже ожидаемого (20-35%) [4, 26]. Это лишний раз свидетельствует о необходимости широкого информирования населения в целом и целевых групп в особенности об исследованиях по разработке анти-ВИЧ-вакцин, важности этих препаратов для общественного здоровья, о важности клинических испытаний и необходимости широкого участия в них представителей всех групп населения.

### **Методы исследований**

Клинические испытания не только позволяют оценить перспективность кандидатных вакцин. Важной задачей клинических исследований анти-ВИЧ-вакцин является получение научных данных, способствующих выяснению механизмов протективного иммунного ответа и определению коррелятов иммунной защиты. Кроме того, клинические исследования являются стимулом для совершенствования методов диагностики и оценки результатов вакцинации, а также их стандартизации.

### **Стандартизация методов лабораторной оценки в клинических исследованиях анти-ВИЧ/СПИД-вакцин**

Методы исследований, используемые в клинических испытаниях анти-ВИЧ/СПИД-вакцин, должны обеспечить решение научных задач, поставленных на соответствующем этапе испытаний, а также обеспечить получение информации, важной для защиты интересов добровольцев (например, подтверждение того, что ВИЧ-сероположительный результат, возникший в процессе клинических испытаний, обусловлен вакцинацией, а не ВИЧ-инфекцией).

При оценке безопасности кандидатных вакцин обычно применяется стандартный набор клинко-диагностических тестов (клинический и биохимический анализы крови и мочи, при необходимости – тестирование на наличие инфекций). При оценке иммунного ответа на кандидатную вакцину проводится определение антител к ВИЧ в сыворотке крови (иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг), оценка лимфопролиферативного ответа, определение субпопуляций лимфоцитов ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ), оценка Т-клеточного иммунного ответа. Во всех случаях следует применять тест-системы и реагенты, сертифицированные в Российской Федерации. Для определения анти-ВИЧ-антител следует использовать тест-системы, позволяющие выявлять антитела против антигенов, входящих в состав исследуемой кандидатной вакцины. В протоколе испытаний должна быть предусмотрена процедура дифференциальной диагностики иммунного ответа на кандидатную вакцину и иммунного ответа на ВИЧ. С этой целью в случае положительного результата определения анти-ВИЧ-антител в ИФА и подтверждении результата в иммуноблоттинге предусматривается проведение ПЦР-диагностики ВИЧ-инфекции. Ее отрицательный результат позволяет сделать заключение о том, что доброволец не является ВИЧ-инфицированным, а положительный результат в ИФА/иммуноблоттинге обусловлен вакцинацией. Очень важно проводить оценку ВИЧ-специфического иммунного ответа, индуцируемого профилактическими или терапевтическими вакцинами, с применением точных стандартизованных методов, что позволило бы сравнивать иммуногенность и относительную эффективность кандидатных вакцин. Различные хорошо разработанные и валидированные методы могут быть использованы для количественной оценки специфического иммунного ответа, а также определения наиболее эффективных стратегий создания вакцин и иммунизации [27].

Исследование иммуногенности кандидатных анти-ВИЧ-вакцин в клинических испытаниях, проводимых в различных сайтах, с помощью стандартизованных методов не-

обходимо для получения достоверных и сравнимых данных. Стандартизованные методы необходимо применять для оценки следующих параметров [27]:

1. ВИЧ-специфический гуморальный иммунный ответ:
  - количественное определение специфических IgG, IgA, IgM;
  - определение нейтрализующей активности антител;
  - эпитопное картирование В-клеток.
2. ВИЧ-специфический клеточноопосредованный иммунный ответ:
  - Th- и ЦТЛ-ответ – эффекторы и клетки памяти;
  - продукция цитокинов;
  - спектр функциональной активности;
  - эпитопное картирование Т-клеток.
3. Врожденный иммунитет:
  - продукция хемокинов;
  - фенотип и цитотоксичность НК-клеток.

В случае исследования терапевтических кандидатных вакцин важно также измерение вирусной нагрузки с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и количественное определение CD8<sup>+</sup>-Т-клеток.

Для оценки ВИЧ-специфического гуморального иммунного ответа необходимо применять стандартизованные тест-системы (*ИФА, иммунный блоттинг*), которые позволяли бы не только выявлять анти-ВИЧ-антитела в сыворотке крови иммунизированных добровольцев, но и позволять дифференцированно определять антитела против антигенов, входящих в состав кандидатной вакцины.

**Оценка нейтрализующей активности антител**, индуцируемых кандидатными анти-ВИЧ-вакцинами является одним из свидетельств потенциальной эффективности изучаемого вакцинного препарата. На этапе III фазы клинических испытаний кандидатных анти-ВИЧ-вакцин оценка нейтрализации вируса является обязательной.

Методическая основа оценки нейтрализации ВИЧ-1 постоянно развивается и совершенствуется. Для определения нейтрализующей активности антител используются различные методики. Все они основаны на оценке изменений уровня вирусной инфекции в чувствительных клетках, которые экспрессируют необходимые для заражения вирусом рецепторы. Методики отличаются по типу используемых клеточных линий, по виду тестирующих тестов для определения вирусной инфекции, по типам вирусов и по количеству циклов инфекции (одноцикловая инфекция или многоцикловая). Хотя эти тесты нейтрализации могут давать качественно сходные результаты в рамках исследования силы нейтрализации [28, 29], имеются существенные различия в точности исследования, воспроизводимости результатов и в возможности проведения анализа большого количества образцов, как, например, в условиях клинических испытаний.

Существенное значение имеет стандартизация параметров теста нейтрализации. Замена первичных Т-клеток человека клеточными линиями, экспрессирующими большие количества CD4, CCR5 и CXCR4 [30-33], позволяет нивелировать фактор наличия индивидуальных особенностей клеток, полученных от различных доноров. Кроме того, предлагается использовать Env-псевдотипированные лентивирусные векторы, экспрессирующие соответствующий Env ВИЧ-1, которые можно клонировать в виде ДНК-плазмид [31, 33, 34]. Env экспрессируется в комплексе (in trans) с дефектным по env ВИЧ, в результате чего Env-псевдотипированные вирионы осуществляют один цикл инфекции, который можно тестировать с помощью репортерного гена, встроенного в геном вируса, или соответствующих клеточных линий [36]. Также перспективным вариантом оценки нейтрализации ВИЧ-1 тестируемыми иммунными сыворотками является методика с использованием мононуклеаров периферической крови доноров, стимулированных фитогемагглютинином, и первичные изоляты, полученные от ВИЧ-пациентов, являющиеся актуальными циркулирующими штаммами (или изоляты, адаптированные к переливаемым Т-клеточным линиям). Существует два варианта проведения данного теста.

В первом варианте (End-point Neutralization Assay) двукратные разведения тестируемых сывороток (1/10 – 1/160) инкубируются в течение 1 часа с фиксированной дозой вируса (10-50 TCID<sub>50</sub>) и затем добавляются перmissive клетки. После 3-кратной процедуры отмывания на 7 сутки культивирования инфицированных клеток определяется уровень ингибирования инфекции с помощью моноклонального анти-p24 ИФА. Титр нейтрализующих антител определяется как 90% ингибирование инфекции в каком-то из разведений тестируемой сыворотки. Контролем служит сыворотка ВИЧ-неинфицированного донора. Второй вариант (Infectivity Reduction Assay) устанавливает нейтрализующий потенциал иммунной сыворотки, при этом используются разведения вируса и фиксированная доза тестируемой сыворотки. Контролем является TCID<sub>50</sub> в присутствии негативной сыворотки. Рассчитывается индекс вирусной нейтрализации.

В настоящее время вполне выполнима задача по созданию стандартизированной панели хорошо охарактеризованных референс штаммов ВИЧ-1, пригодной для оценки нейтрализационных свойств антител, индуцируемых кандидатными вакцинами [36]. Использование соответствующих позитивных и негативных контролей, строгое соблюдение протокола тестирования дают гарантии того, что исследования, проводимые в различных лабораториях, дают сравнимые результаты.

Создание стандартной панели вирусов облегчит процедуру проведения теста нейтрализации, сравнительную проверку результатов исследований по стандартам надлежащих лабораторных и клинических исследований (GLP и GCP) и, главное, позволит создать единые базы данных, пригодные для сравнения новых иммуногенов и отбора наиболее перспективных кандидатных вакцин. Стандартные панели будут полезны для работ по конструированию новых иммуногенов, так как, возможно, с их помощью удастся приблизиться к разрешению тех проблем, которые стоят на пути индукции эффективных нейтрализующих антител, и позволят разработать основную концепцию создания анти-ВИЧ/СПИД-вакцин.

**Для оценки Т-клеточного иммунного ответа, индуцируемого кандидатными анти-ВИЧ/СПИД-вакцинами, применяется широкий спектр методов.**

**Фенотипический анализ**, при котором визуализация клеток производится с помощью специфического окрашивания поверхностных антигенов флуоресцентно мечеными моноклональными антителами с последующей проточной цитометрией, очень важен в характеристике Т-клеточного иммунного ответа. Измерение экспрессии таких поверхностных молекул, как CD4, CD11a, CD18, CD28, рецепторов цитокинов и C-С-хемокинов (CD4<sup>+</sup>-Т-клетки), CD8, CD45RA/RO, CD27, CD28, CD57, CCR7 и CD107a (CD8<sup>+</sup>-Т-клетки) дает возможность точной количественной оценки индивидуальных типов клеток. Применение дополнительных методов позволяет определить их специфичность и функциональность.

Функциональная активность ВИЧ-специфических Т-клеток может быть измерена с помощью **оценки их антиген-стимулированной пролиферации (Lymphoproliferative assay, LPA)**. Мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК), в состав которых входят и CD4<sup>+</sup>, и CD8<sup>+</sup>-Т-клетки, культивируются в присутствии специфических антигенов или пептидов в течение 3-6 суток, после чего проводится импульсное мечение <sup>3</sup>H-тимидином и через 8-16 часов клетки собирают на фильтры. Пролиферация оценивается по включению <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК делящихся клеток.

Специфическая пролиферация после экспозиции с антигенами или пептидами может быть оценена с помощью проточной цитометрии и **окраски лимфоцитов карбоксифлуоресцеин-изотиоцианатом (CFSE)**. Метод позволяет дифференцировать пролиферацию CD4<sup>+</sup>-и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток, а также получить информацию о фенотипе и цитокиновом профиле делящихся клеток при сочетании с визуализацией поверхностных маркеров с помощью окрашивания флуоресцентномечеными моноклональными антителами и внутриклеточным окрашиванием цитокинов.

**Широкое применение в клинических испытаниях нашел ELISpot – метод количественной оценки специфического Т-клеточного ответа, индуцированного вакциной [37].**

ELISpot представляет собой мощный инструмент, позволяющий количественно оценить частоту встречаемости ВИЧ-специфических CD4<sup>+</sup>- или CD8<sup>+</sup>-Т-клеток путем определения антиген-индуцированной секреции цитокинов. Этот метод успешно применяется для количественной оценки Т-клеточного иммунного ответа у людей, инфицированных различными патогенами, в том числе ВИЧ, и для изучения Т-клеточной иммуногенности вакцин в клинических испытаниях I, II и III фазы [38]. ELISpot является быстрым (2 дня) и чувствительным (порог определения > 0,005%) количественным методом, позволяет использовать замороженные клетки и дает возможность определить эпитопную специфичность. Этот метод валидирован для применения в клинических испытаниях кандидатных анти-ВИЧ/СПИД-вакцин [39, 40]. ELISpot достаточно прост в исполнении, обладает высокой чувствительностью и специфичностью, воспроизводимостью и успешно применяется многими исследовательскими группами.

Для ELISpot установлены четкие критические значения (cut-offs) интерпретации результата как положительного: количество пятнообразующих клеток должно быть более 50 на 10<sup>6</sup> клеток и как минимум в 2 раза превышать количество пятнообразующих клеток в нестимулированной культуре.

Сравнение ELISpot и **внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICCS)** позволило сделать заключение, что оба метода дают сравнимые результаты и, соответственно, могут быть взаимозаменяемы при оценке ВИЧ-специфического Т-клеточного иммунного ответа в клинических исследованиях кандидатных анти-ВИЧ-вакцин [41].

Методы «первой линии» исследования Т-клеточного иммунного ответа, индуцируемого кандидатными анти-ВИЧ-вакцинами (фенотипический анализ, **оценка антиген-стимулированной пролиферации**, ELISpot, **внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICCS)** могут быть дополнены методами «второй линии» – функциональной оценкой (мультипараметрическая проточная цитометрия) способности к секреции цитокинов/хемокинов, экспрессии фенотипа клеток памяти и клеток-эффекторов – CD45RA/RO, CD28, CD27, CCR7 и CD57, перфорина, гранзимов А и В, оценкой цитолитической функции (CD107a).

Еще один цитофлуориметрический метод, широко используемый для определения антиген-специфических Т-клеток, включает **внутриклеточное окрашивание цитокинов и тетрамеров МНС II класса/пептид** [42]. Секреция эффекторных цитокинов и растворимых медиаторов (перфорин, ИФН-гамма, TNF-альфа, ИЛ-2 и ИЛ-4) антиген-специфичными CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клетками является регулируемым процессом, который играет важную роль в иммунной защите против патогенов. Соответственно, количественное определение таких клеток дает возможность выявить патофизиологическую взаимосвязь между ВИЧ-1 и количеством и функциональной активностью Т-клеток. Технология тетрамеров основана на высокоспецифичном взаимодействии между комплексом МНС II класса/пептид и распознающим его Т-клеточным рецептором. В этом методе используются мультимерные комплексы МНС II класса/пептид как выявляющий реагент для антиген-специфических Т-клеток, что позволяет количественно определять антиген-специфические Т-клетки независимо от их функциональной активности. Технология следующего поколения – использование **пентамерных комплексов МНС II класса/пептид** – позволяет связывать Т-клеточный рецептор с очень высокой avidностью.

Мультимерные комплексы МНС I класса/пептид были разработаны для специфического связывания с Т-клеточным рецептором ЦТЛ. **Окрашивание тетрамерными/пентамерными комплексами МНС I класса/пептид** позволяет выявить клетки памяти и эффекторные клетки.

Перечисленные методы позволяют всесторонне охарактеризовать индуцированный кандидатной вакциной ВИЧ-специфический иммунный ответ. Они достаточно хорошо стандартизуемы и могут быть эффективно использованы для анализа материалов, полученных в ходе клинических испытаний.

Однако в ряде случаев может оказаться целесообразным применение дополнительных методов изучения материалов, полученных в ходе клинических исследований кандидатных анти-ВИЧ-вакцин. Использование дополнительных методов определяется научными задачами, поставленными в конкретном клиническом исследовании, зависит от вида исследуемой кандидатной анти-ВИЧ-вакцины и прописывается в протоколе клинического исследования.

Литическая активность ВИЧ-специфических ЦТЛ может быть определена с помощью классических стандартных методов, в которых радиоактивно меченые клетки-мишени культивируются совместно с ЦТЛ, которые выделены из крови добровольца (пациента) или предварительно стимулированы *in vitro*. Лизис клеток-мишеней специфическими ЦТЛ может быть количественно оценен **по высвобождению  $^{51}\text{Cr}$**  в культуральную жидкость. Однако наблюдается значительный разброс данных, а сам метод является достаточно трудоемким. В настоящее время разработаны колориметрические методы оценки, созданы соответствующие наборы, позволяющие оценить литическую активность без использования  $^{51}\text{Cr}$  и, соответственно, позволяющие избежать использования радиоактивной метки.

**Метод лимитирующих разведений** является мощным, достоверным и чувствительным инструментом для анализа, детекции и точной количественной оценки различных типов антиген-специфических Т-лимфоцитов. С его помощью можно оценивать частоту предшественников индивидуальных типов клеток, специфичных к определенному антигену, в популяции PBMC. Метод позволяет выявить ВИЧ-специфические ЦТЛ при частоте 1 клетка на 10 000 PBMC, в то время как оценка прямого киллинга, когда PBMC добавляются непосредственно к клеткам-мишеням, позволяет выявить лишь 100 ЦТЛ на 10 000 PBMC. В качестве параметров оценки используются пролиферация, продукция ИЛ-2, ИЛ-4 и/или цитотоксичность [43]. Метод лимитирующих разведений является одним из наиболее активно используемых лабораторных методов, но он плохо поддается стандартизации.

Анализ проведенных клинических исследований показывает, что результаты оценки иммуногенности экспериментальных анти-ВИЧ-вакцин стандартными методами могут не коррелировать с противовирусной эффективностью и часто не позволяют выявить важные особенности иммунного ответа на исследуемый вакцинный препарат. Примером развития методического обеспечения клинических исследований может служить метод заражения *in vitro* (IVCA), который позволяет оценить на моноклеарах периферической крови общую противовирусную активность против любого изолята ВИЧ-1. Это простой и эффективный метод может быть полезен для определения перспективности кандидатных вакцин при полевых испытаниях эффективности [44].

В связи с возрастающим количеством кандидатных вакцин, которые проходят клинические испытания в различных странах, необходимо совершенствовать методы, позволяющие дифференцировать антитела, индуцированные вакциной, от антител, образование которых связано с ВИЧ-инфекцией. Примером современных разработок в этой области может служить новый **тест для серологического определения ВИЧ-1, названный HIV-SELECTEST**. С помощью библиотеки кДНК, представляющей полный геном ВИЧ-1, выбраны консервативные последовательности Env-gp41 и Gag-pb, которые выявляются на ранних сроках после инфекции, не содержат протективных эпитопов и не являются частью большинства анти-ВИЧ/СПИД-вакцин, исследуемых в настоящее время. Получены соответствующие пептиды. При испытаниях HIV-SELECTEST показал специфичность и чувствительность >99%. HIV-SELECTEST – представляет собой простой, но сильный диагностический инструмент, который несложно применять в испытаниях анти-ВИЧ/СПИД-вакцин, а также при проверке банков крови [45].



Аденовирусные векторы широко используются в качестве систем доставки в кандидатных анти-ВИЧ/СПИД-вакцинах. **Тест сбрасывания аденовируса (adenovirus-shedding assay)** может быть использован в клинических испытаниях векторных вакцин, в частности, для мониторинга безопасности. ПЦР-анализ позволял различить Ad5HIVgag и Ad5 дикого типа (WT Ad5) в образцах, полученных в клинических исследованиях [46].

Кроме гуморального и Т-клеточного иммунный ответа, индуцированного анти-ВИЧ-вакциной, существуют и другие механизмы, способные играть важную роль в протективном действии вакцины. Антитела, присоединяющиеся к поверхности инфицированной клетки, могут рекрутировать NK-клетки, что приводит либо для уничтожению зараженных клеток (антитело-зависимая клеточная цитотоксичность, ADCC), либо к ингибированию вирусной репликации (антитело-зависимое клеточно-опосредованное вирусное ингибирование, ADCVI).

**При оценке ADCC** измеряется гибель клеток-мишеней ( $CD4^+$ -Т-клеточные линии или первичные  $CD4^+$ -Т-клетки), экспрессирующих антигены ВИЧ, при воздействии NK-клеток в присутствии исследуемых антител (иммунных сывороток). Гибель клеток-мишеней оценивается по выходу красителя или иного маркерного вещества.

В качестве клеток-мишеней чаще всего используются  $CD4^+$ -Т-клеточные линии, поскольку они более устойчивы к лизису при воздействии NK-клеток в отсутствии антител. Сначала клетки-мишени либо заражают ВИЧ, либо адсорбируют gp120 (или другой гликопротеин), а затем добавляют эффекторные клетки. Источником эффекторных NK-клеток являются мононуклеары периферической крови (PBMCs) ВИЧ-инфицированных пациентов. Так как PBMCs ВИЧ-инфицированных пациентов обогащены NK-клетками, то считают, что клеточная гибель вызвана, главным образом, их действием. В настоящее время ведутся работы по стандартизации ADCC-теста [47].

**ADCVI-тест** включает зараженные клетки-мишени (первичные  $CD4^+$ -Т-клетки или  $CD4^+$ -Т-клеточные линии), NK-клетки и источник антител. Оценивают степень ингибирования вирусной продукции при воздействии NK-клеток в присутствии антител. Так как ингибирование вирусной репликации может быть следствием действия различных природных иммунных клеток, то при проведении ADCVI-теста можно использовать NK-клетки, нефракционированные PBMCs или другие типы природных иммунных клеток, такие как моноциты и макрофаги. В качестве клеток-мишеней используются либо первичные  $CD4^+$ -Т-клетки, либо  $CD4^+$ -Т-клеточные линии, которые обладают большей устойчивостью к лизису NK-клетками в отсутствии антител.

Клетки-мишени заражают ВИЧ-1 в течение 48 часов, затем внеклеточный вирус удаляют отмыванием и добавляют ВИЧ-специфические антитела и эффекторные клетки. По истечении 7 суток оценивают продукцию вируса по уровню p24 ВИЧ-1, определяемого с помощью ИФА. Активность исследуемых антител в опытных образцах иммунных сывороток определяется по снижению содержания p24 в сравнении с контрольными образцами, не содержащими специфических антител.

Включение дополнительных тестов для оценки иммунного ответа при клинических исследованиях кандидатных анти-ВИЧ вакцин позволит более полно и качественно прогнозировать эффективность того или иного вакцинного препарата. Оценка этих параметров даст возможность получить дополнительные научные данные, важные для понимания молекулярных и клеточных механизмов иммунной защиты против ВИЧ-инфекции.

Для достоверного сравнения данных клинических исследований, особенно широкомасштабных, которые проводятся на базе различных учреждений в различных регионах и странах, необходимо использование общих стандартных операционных процедур (СОП) и протоколов в соответствии с национальными и международными стандартами.

## Литература

1. Rerks-Ngarm S., Pitisuttithum P., Nitayaphan S. et al., Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* 2009, v.361, p.2209-2220.
2. Карамов Э.В., Сидорович И.Г., Хаитов Р.М. Новая вакцинология. Вакцины против ВИЧ/СПИДа. 2008 г.
3. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А. СПИД. М.: Народная академия культуры и общечеловеческих ценностей, 1992. 352 с.
4. Хаитов Р.М., Решетников А.В., Сидорович И.Г., Карамов Э.В., Гудима Г.О. Клинические испытания первой отечественной анти-ВИЧ/СПИД-вакцины 2009 М: ГЭОТАР-Медиа, 671 с.
5. AIDS Vaccine Blueprint, 2008.
6. Global HIV Vaccine Enterprise, *Nat. Med.*, 2010.
7. Jefferys R., Harrington M. Outstanding questions on HIV vaccine trial. *Science*, 2004, v.305, no.5681, p.180.
8. Newman P.A., Duan N., Rudy E.T., Anton P.A. Challenges for HIV vaccine dissemination and clinical trial recruitment: if we build it, will they come? *AIDS Patient Care STDS*, 2004, v.18, no.12, p.691-701.
9. Федеральный закон об обращении лекарственных средств N 61-ФЗ от 12 апреля 2010 года.
10. WHO GCP Guideline, 1995.
11. Этические аспекты научных исследований по разработке вакцин для профилактики ВИЧ. Руководящий документ ЮНЭЙДС. UNAIDS, 2001.
12. Национальный стандарт Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика (Good Clinical Practice (GCP))». ГОСТ Р 52379-2005, утвержден приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии № 232-ст от 27 сентября 2005 г., дата введения – 1 апреля 2006 года.
13. Tubian R., Carcelain G., Vray M., Gourlain K., Dalban C., Chermak A., Rabian C., Vittecoq D., Simon A., Bouvet E., El Habib R., Costagliola D., Calvez V., Autran B., Katlama C. Therapeutic immunization with a human immunodeficiency virus (HIV) type 1-recombinant canarypox vaccine in chronically HIV-infected patients: The Vacciter Study (ANRS 094). *Vaccine*, 2005, v.23, p.4292–4301.
14. HVTN 502 and HVTN 503 HIV Vaccine Clinical Trials. Questions and answers. National Institute of Allergy and Infectious Diseases/ NIH. October 23, 2007.
15. Veljkovic V., Veljkovic N., Glisica S., Hob M.-W. AIDS vaccine: Efficacy, safety and ethics *Vaccine*, 2008, v.26, no.24, p.3072-3077.
16. Белоусов Ю.Б., Белоусов Д.Ю. Методика планирования и проведения клинических испытаний. М., 2000.
17. Understanding AIDS Vaccines, 2004.
18. Maek-A-Nantawat W., Pitisuttithum P., Phonrat B., Bussaratid V., Naksrisook S., Peonim W., Thantamnu N., Muanaum R. Evaluation of attitude, risk behavior and expectations among Thai participants in Phase I/II HIV/AIDS vaccine trials. *J. Med. Assoc. Thai.*, 2003, v.86, no.4, p.299-307.
19. Lampinen T.M., Chan K., Remis R.S., Merid M.F., Rusch M., Vincelette J., Logue K., Popovic V., Alary M., Schechter M.T., Hogg R.S. Sexual risk behaviour of Canadian participants in the first efficacy trial of a preventive HIV-1 vaccine. *CMAJ*, 2005, v.172, no.4, p.479-483.
20. Moodley K., Barnes J., van Rensburg E.J., Myer L. Willingness to participate in South African HIV vaccine trials – concerns of medical professionals in the Western Cape. *S. Afr. Med. J.*, 2002, v.92, no.11, p.904-906.
21. Mugenyi P.N. HIV vaccines: the Uganda experience. *Vaccine*, 2002, v.20, no.15, p.1905-1908.
22. Kiwanuka N., Robb M., Kigozi G., Birx D., Philips J., Wabwire-Mangen F., Wawer M.J., Nalugoda F., Sewankambo N.K., Serwadda D., Gray R.H. Knowledge about vaccines and willingness to participate in preventive HIV vaccine trials: a population-based study, Rakai, Uganda. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2004, v.36, no.2, p.721-725.
23. Jenkins R.A., Temoshok L.R., Virochsiri K. Incentives and disincentives to participate in prophylactic HIV vaccine research. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 1995, v.9, no.1, p.36-42.
24. Colfax G., Buchbinder S., Vamshidar G., Celum C., McKirnan D., Neidig J., Koblin B., Gurwith M., Bartholow B. Motivations for participating in an HIV vaccine efficacy trial. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2005, v.39, no.3, p.359-364.
25. Mills E., Cooper C., Guyatt G., Gilchrist A., Rachlis B., Sulway C., Wilson K. Barriers to participating in an HIV vaccine trial: a systematic review. *AIDS*, 2004, vol.18, no.17, p.2235-2242.
26. Buchbinder S.P., Metch B., Holte S.E., Scheer S., Coletti A., Vittinghoff E. Determinants of enrollment in a preventive HIV vaccine trial: hypothetical versus actual willingness and barriers to participation. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2004, v.36, no.1, p.604-612.

27. Gotch F., Holmes H., Imamia N. The importance of standardisation of laboratory evaluations in HIV vaccine trials. *Microbes and Infection*, 2005, v.7, no.14, p.1424-1432.
28. D'Souza M.P., Kent K.A., Thiriart C., Collignon, and G. Milman. International collaboration comparing neutralization and binding assays for monoclonal antibodies to simian immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1993, v.9, p.415-422.
29. Letvin N.L., Walker B.D.. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med.*, 2003 v.9, no.7, p.861-866.
30. Vujcic L., D. Katzenstein, M. Martin, and G. Quinnan. 1990. International collaborative study to compare assays for antibodies that neutralize human immunodeficiency virus. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses*, v.6, p.847-853.
31. Montefiori D.C. 2004. Evaluating neutralizing antibodies against HIV, SIV and SHIV in a luciferase reporter gene assay, p. 12.11.1-12.11.15. In J. E. Coligan A. M. Kruisbeek D. H. Margulies E. M. Shevach, W. Strober, and R. Coico (ed.), *Current protocols in immunology*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
32. Richman D.D., Wrin T., Little S.J., and Petropoulos C.J. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, v.100, p.4144-4149.
33. Platt E.J., Wehrly K., Kuhmann S.E., B. Chesebro and Kabat D. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, 1998, v.72, p.2855-2864.
34. Wei X., Decker J. M., Wang S., Hui H., Kappes J. C., Wu X., Salazar-Gonzalez J. F., Salazar M. G., Kilby J. M., Saag M. S., Komarova N. L., Nowak M. A., Hahn B. H., Kwong P. D and Shaw G. M / Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, 2003, v.422, p.307-312.
35. Binley J.M., Wrin T., Korber B., Zwick M.B., Wang M., Chappey C., Stiegler G., Kunet R., Zolla-Pazner S., Katinger H., Petropoulos C.J., Butron D.R. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 2004, v. 78, p.13232-13252.
36. Moore J.P., Burton D. R. Urgently needed: a filter for the HIV-1 vaccine pipeline. *Nat. Med.*, 2004, v.10, p.769-771.
37. Mashishi T., Gray C.M. The ELISpot assay: an easily transferable method for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2002, v.40, no.9, p.903-910.
38. Hudgens M.G., Self S.G., Chiu Y.L., Russell N.D., Horton H., McElrath M.J. Statistical considerations for the design and analysis of the ELISpot assay in HIV-1 vaccine trials. *J. Immunol. Methods*, 2004, v.288, no.1-2, p.19-34.
39. Mwau M., McMichael A.J., Hanke T. Design and validation of an enzyme-linked immunospot assay for use in clinical trials of candidate HIV vaccines. *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, 2002, v.18, no.9, p.611-618.
40. Russell N.D., Hudgens M.G., Ha R., Havenar-Daughton C., McElrath M.J. Moving to human immunodeficiency virus type 1 vaccine efficacy trials: defining T cell responses as potential correlates of immunity. *J. Infect. Dis.*, 2003, v.187, no.2, p.226-242.
41. Draenert R., Altfeld M., Brander C., Basgoz N., Corcoran C., Wurcel A.G., Stone D.R., Kalams S.A., Trocha A., Addo M.M., Goulder P.J., Walker B.D. Comparison of overlapping peptide sets for detection of antiviral CD8 and CD4 T cell responses. *J. Immunol. Methods*, 2003, v.275, p.19-29.
42. Novak E.J., Liu A.W., Nepom G.T., Kwok W.W. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J. Clin. Invest.*, 1999, v.104, p.R63-R67.
43. Imami N., Brookes P.A., Lombardi G., Hakooz B., Johns M., Goldman J.M., Batchelor J.R., Lechler R.I., Ritter M.A. Association between interleukin-4-producing T lymphocyte frequencies and reduced risk of graft-versus-host disease. *Transplantation*, 1998, v.65, p.979-988.
44. John R., Arango-Jaramillo S., Self S., Schwartz D.H. Modeling partially effective HIV vaccines in vitro. *J. Infect. Dis.*, 2004, v.189, no.4, p.616-623.
45. Khurana S., Needham J., Mathieson B., Rodriguez-Chavez I.R., Catanzaro A.T., Bailer R.T., Kim J., Polonis V., Cooper D.A., Guerin J., Peterson M.L., Gurwith M., Nguyen N., Graham B.S., Golding H. Human immunodeficiency virus (HIV) vaccine trials: a novel assay for differential diagnosis of HIV infections in the face of vaccine-generated antibodies. *J. Virol.*, 2006, v.80, no.5, p.2092-2099.
46. Wang F., Patel D.K., Antonello J.M., Washabaugh M.W., Kaslow D.C., Shiver J.W., Chirmule N. Development of an adenovirus-shedding assay for the detection of adenoviral vector-based vaccine and gene therapy products in clinical specimens. *Hum. Gene Ther.*, 2003, v.14, no1, p.25-36.
47. IAVI Report, Nov.-Dec. 2009.

## **7.2. ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ КАНДИДАТНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИЧ/СПИД. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ПРИВИТЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ**

*СОСТАВИТЕЛИ: д. б. н. Л.И. Карпенко, к. б. н. А.Б. Рыжиков, к. б. н. М.П. Богрянцева, к. б. н. С.В. Усова, О.Н. Каплина, к. б. н. С.И. Бажан, к. б. н. Е.Д. Даниленко, д. б. н., проф. В.И. Масычева, к. м. н. Е.А. Нечаева, д. б. н., проф. А.А. Ильичев, д. м. н., проф. М.С. Воробьева, к. м. н. К.А. Саркисян, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Центр экспертизы и контроля МИБП*

Возбудитель ВИЧ-инфекции был открыт более 20 лет назад, с тех пор и по настоящее время ВИЧ-инфекция распространяется по всему миру, охватывая как развитые, так и развивающиеся страны. СПИД занимает четвертое место по количеству смертельных исходов в мире. По данным ВОЗ, к 2000 году от СПИДа в мире умерло 14,5 миллионов человек, к 2009 году – более 22 млн человек. Общее количество инфицированных в мире достигло более, чем 40 млн человек. Молодые люди до 25 лет и дети составляют примерно 25% от всех лиц, живущих с диагнозом СПИД в мире.

В России число ВИЧ-инфицированных достигло более 400 тыс. человек, среди них 80% лиц в возрасте от 15 до 30 лет, более 11 тысяч детей в возрасте до 14 лет.

Несмотря на принимаемые санитарно-профилактические мероприятия по предотвращению распространения ВИЧ-инфекции во всем мире, в том числе и в России, ситуация продолжает оставаться достаточно серьезной.

Количество ВИЧ-инфицированных ежегодно продолжает увеличиваться, особенностью последнего десятилетия является то, что инфекция распространяется не только среди лиц, относящихся к группам риска (наркоманы, проститутки, гомосексуалисты), но и поражает здоровых, не относящихся к этим категориям граждан.

Наиболее перспективным направлением, по мнению мирового научного сообщества в целом и отечественных ученых, стратегией защиты населения от этого заболевания, достигшего в последние годы уровня пандемии, является скорейшее создание эффективной профилактической вакцины. По предварительным оценкам экспертов, создание и применение вакцины против ВИЧ/СПИДа снизило бы количество новых случаев инфицирования ВИЧ на 20–80%. Это особенно важно в связи с тем, что до настоящего времени не выявлено случаев выздоровления при ВИЧ-инфекции, как самопроизвольного, так и после соответствующей химиотерапии.

Работы по созданию вакцины против ВИЧ/СПИДа были начаты вскоре после открытия и идентификации вируса.

К настоящему времени предложено более 400 вариантов вакцин против ВИЧ/СПИДа, 38 из них находятся на стадии клинических испытаний.

При создании анти-ВИЧ-вакцин использовались и используются различные технологические подходы:

- живые аттенуированные вакцины;
- инаktivированные вакцины;
- вирусоподобные частицы;
- субъединичные вакцины (субъединичные вакцины на основе компонента оболочки вируса; субъединичные вакцины на основе неструктурных белков ВИЧ-1);
- ДНК-вакцины и рекомбинантные векторные вакцины;

- белки и пептиды ВИЧ;
- сочетания иммуногенов для «прайм-буст»-иммунизации.

При разработке вакцин против ВИЧ/СПИДа исследователи столкнулись с целым рядом существенных проблем:

- оказалось, что традиционные методы получения вакцин неприемлемы для создания вакцины против ВИЧ/СПИДа. Использование живого аттенуированного вируса или инактивированного полного вирионного антигена не представляется возможным из-за опасности ВИЧ-инфекции для вакцинируемого;
- серьезным препятствием для создания вакцины является высокая вариабельность вируса ВИЧ;
- не определена природа возможной иммунной защиты, которая должна развиваться после введения вакцины, против ВИЧ-инфекции;
- для ВИЧ-инфекции нет адекватной лабораторной модели животных, что затрудняет исследование механизмов протективного иммунного ответа, что, в свою очередь, затрудняет оценку кандидатных вакцин в доклинических и клинических испытаниях.

В связи с этим оценить безопасность, иммуногенность и эффективность новых вакцин для человека можно только в клинических исследованиях.

В России различными авторскими коллективами (Институт иммунологии ФМБА, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», С-Петербургским НИИ ВЧБ) разработаны, прошли доклинические испытания и находятся на разных стадиях клинического исследования (1 или 2 фазы) три кандидатные вакцины против ВИЧ/СПИДа: «ВИЧРЕПОЛ», «КОМБИ-ВИЧВАК», «ДНК-4».

Клинические исследования с участием здоровых неинфицированных ВИЧ-добровольцев являются неотъемлемой частью исследований, направленных на разработку вакцины против ВИЧ/СПИДа.

Клинические испытания вакцин против ВИЧ/СПИДа решают две основные задачи: с одной стороны – это регламентированное испытание вакцинных препаратов с участием добровольцев, с другой стороны – научное исследование, которое позволит получить новые данные о биологии и иммунологии ВИЧ, о патогенезе ВИЧ-инфекции, дает возможность отработать схемы иммунизации и провести необходимую корректировку состава и свойств вакцинного препарата.

При организации клинических испытаний вакцин против ВИЧ/СПИДа имеются особенности и трудности при формировании когорты добровольцев, что связано со слабой или недостаточной информированностью населения о ВИЧ-инфекции, о создании и применении вакцин. Существует негативное отношение населения ко всему, что связано с ВИЧ-инфекцией, с опасностью заражения.

В мировой практике клинических исследований вакцин против ВИЧ/СПИДа отработаны методы привлечения добровольцев к клиническим испытаниям, создана система их социальной и этической защиты, определены нормы медицинского обеспечения, на проведение клинических испытаний выделяются государственные средства и средства неправительственных фондов.

Клинические исследования проводятся на основании разрешения на проведение клинического исследования в соответствии с правилами клинической практики в одной или нескольких медицинских организациях, аккредитованных в установленном порядке на данный вид деятельности.

При проведении клинических испытаний кандидатных вакцин против ВИЧ/СПИДа первоочередной задачей является оформление Протокола клинических исследований. Протокол представляет собой научно обоснованный и подробный план клинического исследования. В Протоколе подробно описаны специфические цели и задачи исследования, а также приведены мероприятия, направленные на сохранение здоровья добровольцев – участников исследования.

Должны быть указаны критерии, по которым проводится отбор добровольцев (главные из них – отсутствие антител к ВИЧ в сыворотки крови добровольца до начала испытаний, отсутствие контакта с ВИЧ-инфицированными на всех этапах исследования), дается перечень и описание методов подготовки биологических проб (кровь, сыворотка, моча) для проведения контролей на различных этапах клинического исследования, дается точная и детализированная схема проведения вакцинации изучаемым препаратом с указанием дозировок, сроков и методов введения.

В процессе проведения испытаний добровольцы в определенные сроки должны проходить медицинское обследование для мониторинга состояния их здоровья и определения безопасности и эффективности проводимой вакцинации.

Вакцинируемые добровольцы должны быть осведомлены о том, что проводимая вакцинация может быть потенциально полезной для них. Большое значение имеет этическая сторона проведения испытаний – пациенты должны понимать, что они участвуют в исследовании, которое может принести пользу всем людям, которые могут быть подвержены риску инфицирования. Каждый доброволец по завершении исследований должен получить документ, содержащий информацию об его участии в испытаниях и о возможном наличии у него в крови специфических анти-ВИЧ антител, приобретенных в процессе вакцинации.

Коллектив специалистов, проводящих клинические исследования, должен включать квалифицированных врачей, медицинских сестер, социальных работников.

Для проведения исследований должна быть разработана форма информированного согласия на участие добровольца в исследованиях, разработан дневник наблюдений за привитым в течение всего периода клинических наблюдений, информационный листок пациента, участвующего в клинических исследованиях. Добровольцы, принимающие участие в проведении клинических исследований, должны быть застрахованы, не допускается участие добровольца в проведении клинического исследования при отсутствии договора обязательного страхования. Согласие добровольца на участие в клиническом исследовании подтверждается его подписью в информационном листке пациента. Доброволец имеет право отказаться от участия в клиническом исследовании на любой стадии проведения такого исследования.

Клинические исследования проводятся в несколько этапов, или фаз. Для каждой фазы исследований разрабатывается отдельный Протокол клинических исследований, т.к. каждая фаза имеет различные цели и задачи.

Первая фаза связана с определением безопасности и переносимости, вторая фаза – безопасности, переносимости и иммуногенности на большей группе добровольцев, третья фаза – безопасности, переносимости, иммуногенности и эффективности. Четвертая фаза – пострегистрационные наблюдения тех же показателей, что и на третьей фазе.

Определение безопасности является главным содержанием 1 фазы исследований. Группа добровольцев – небольшая (от 15 до 80 человек). В соответствии с особенностями испытуемого препарата могут проводиться специальные исследования, добровольцы могут быть госпитализированы на короткое время в стационар. При проведении 1 фазы не планируется применения плацебо. Важной задачей 1 фазы является определение максимальной дозы, при которой вакцина может быть безопасно применена. Обычно часть добровольцев получает самую низкую дозу и за ними проводится наблюдение, затем следующая группа получает более высокую дозу, следующая группа добровольцев получает еще более высокую дозу и т. д., до установления максимальной дозы, дающей иммунный ответ без проявления побочных явлений.

Вторая фаза – чаще всего проводится повторение исследований 1 фазы на большей группе добровольцев (100–300 человек) для уточнения специфического действия кандидатной вакцины ВИЧ/СПИД в части иммуногенности и безопасности. Во время проведения 2 фазы исследований подтверждается эффективность выбранных во время первой фазы дозы и метода введения вакцины.

При проведении 2 фазы иногда планируется применение плацебо.

Третья фаза клинических исследований имеет целью установление эффективности вакцины ВИЧ/СПИД.

На еще большей группе добровольцев (1000–3000 человек) проводятся испытания эффективности в сравнении с вакциной – аналогом, уже прошедшей клинические испытания. Как правило, это многоцентровые исследования, которые проводятся параллельно в нескольких медицинских клинических центрах. Участники исследования и клиницисты – наблюдатели не должны знать, какой препарат (вакцину, препарат сравнения или плацебо) получают добровольцы – двойное, слепое рандомизированное исследование, в котором предусмотрены все условия получения достоверности результатов и оценки эффективности и безопасности препарата. Особенностью проведения клинических испытаний 3 фазы при исследовании кандидатных вакцин ВИЧ является необходимость создания групп привитых разными материалами и проведение последующего наблюдения за привитыми в зоне риска заражения ВИЧ с тем, чтобы определить истинные возможности новой испытываемой вакцины в защите против заражения ВИЧ. При таких условиях необходимо изучение сывороток крови привитых на различных сроках после вакцинации для определения вируснейтрализующей активности сывороток, а также для уточнения того, являются ли антитела в крови привитых следствием вакцинного иммунного ответа или появились после контакта с ВИЧ-инфицированным и заражения ВИЧ.

## **ОСОБЕННОСТИ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ДОБРОВОЛЬЦЕВ НА ВВЕДЕНИЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ-1**

### **Гуморальный ответ**

Особенности оценки специфического иммунного ответа у добровольцев на введение вакцины против ВИЧ-1 прежде всего определяется особенностями вакцинных конструкций, состава иммуногенов, средств доставки и адъювантов. В частности, при исследовании иммуногенности полиэпитопных вакцин, полученных на основе искусственных рекомбинантных белков, содержащих только отдельные эпитопы из белков ВИЧ-1, а также при анализе иммуногенности ДНК-вакцин, не всегда возможно использование стандартных коммерческих тест-систем.

Исследование ВИЧ-специфического гуморального ответа у добровольцев, вакцинированных анти-ВИЧ вакциной.

### **ИФА с использованием рекомбинантных антигенов**

Иммуноферментный анализ (ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) — лабораторный иммунологический метод качественного и количественного определения антигенов и антител.

Принцип иммуноферментного анализа (ИФА) основан на образовании иммунного комплекса специфических антител с антигеном, иммобилизованным на полистироловом планшете, с последующим его выявлением антивидовым конъюгатом, меченным ферментом.

В качестве антигена используют рекомбинантные вирусные белки, которые позволяют значительно повысить чувствительность и специфичность теста. Технология получения рекомбинантных белков позволяет получить в достаточно чистом виде аналог любого отдельного антигена.

Конъюгат получают с использованием поликлональных антивидовых антител (например, кроличьи антитела против иммуноглобулинов человека) или моноклональных антител, направленных против человеческих иммуноглобулинов определенного класса (M, G, A). Для ферментативной метки конъюгата могут быть применены разнообразные ферменты: пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза,

глюкозооксидаза и др. Во всех коммерческих тест-системах используется пероксидаза хрена, выбор которой определяется ее высокой удельной каталитической активностью, доступностью, стабильностью, простотой детекции. В качестве субстратного реагента также применяются разнообразные хромогенные вещества, продукты окисления которых регистрируются фотометрически при определенных длинах волн (волновой диапазон 340-750 нм).

Ферментативная активность пропорциональна содержанию специфических антигенов в сыворотке и проявляется при помощи субстратов для данного фермента. Положительную реакцию интерпретируют при помощи спектрофотометра (ридера) на основании степени окрашивания в сравнении с отрицательным контролем.

Широкое использование стандартной конфигурации 96-луночного планшета позволило унифицировать оборудование, необходимое для проведения иммуноферментного анализа.

Иммуноферментный метод обладает рядом существенных преимуществ перед традиционными иммунологическими реакциями, главными из которых являются высокая чувствительность, специфичность, возможность получения количественных данных, воспроизводимость, стандартизация основных ингредиентов анализа, возможность автоматизации всех этапов постановки.

Основное достоинство этого метода – возможность определения инфекции и возможность проследить динамику развития процесса, на который указывает уровень антител. Недостаток – относясь к непрямым методам диагностики, он позволяет определить иммунный ответ организма на возбудителя, а не самого возбудителя.

Для определения ВИЧ-специфичных АТ производят забор крови у вакцинированных добровольцев в контрольных точках, согласно протоколу клинических испытаний.

### **Этапы иммуноферментного анализа**

Антиген разводят в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,5-9,7 (буфер присоединения), в раститровке. Рабочее разведение подбирают «шахматным» титрованием антигена, антител (положительного и отрицательного контроля) и конъюгата.

Для каждой новой серии антивидового конъюгата, антигена или при смене полистироловых планшетов одной фирмы на другую необходимо снова опытным путем («шахматное» титрование) подобрать оптимальные разведения антигена и конъюгата, которые станут рабочими.

### **Метод иммуноферментного анализа (ИФА)**

Для постановки иммуноферментного анализа используют рекомбинантные белки.

1. Сорбция антигена в карбонат-бикарбонатном буфере (разведение подобрать в предварительных экспериментах). Инкубируют 2 часа в термостате при 37 °С и ночь в холодильнике при +4 °С.

2. Блокировка раствором PBS с казеином. Инкубация 1 час при комнатной температуре.

3. Промывание планшета четырехкратное раствором PBS с Твином-20 на вошере. Отмывочным раствором, «отбить» на фильтровальную бумагу, просушить.

4. Внесение сывороток.

Сыворотки разводят в фосфатно-солевом буфере, с казеином и детергентом, в разведении 1:50 и далее кратное число раз (2, 3, 5 или 10-кратное).

В лунку добавляют исследуемую сыворотку, и, если в ней есть антитела (эти антитела называются первыми) к данному антигену, во время инкубации происходит взаимоузнавание, в результате которого образуется принципиально значимая связь антиген/антитело.



Инкубируют в термошейкере 1,5 часа при 37 °С.

5. Промывание планшета четырехкратное раствором PBS с Твином-20 на вошере отмывочным раствором, «отбить» на фильтровальную бумагу, просушить.

6. После отмывки лунок от не связавшихся (а значит неспецифичных) субстанций в каждую лунку добавляют так называемые вторые антитела, меченые ПХ (конъюгат).

Необходимо помнить, что при разведении конъюгата перемешивать раствор надо осторожно, не вспенивая его, так как это приведет к денатурации фермента.

Инкубируют на шейкере 1 час при 37 °С.

7. Промывание планшета четырехкратное раствором PBS с Твином-20 на вошере, отмывочным раствором, «отбить» на фильтровальную бумагу, просушить.

Субстрат (ТМБ) для пероксидазы разводят в цитратно-фосфатном буфере, pH 5,5-6,0, не более чем за 30-60 минут до использования. Вносят в лунки планшета для проявления реакции. Инкубируют 20-30 минут при комнатной температуре в темноте, реакцию останавливают добавлением равного объема 1 н серной кислоты, определяя оптическую плотность при 450 нм на фотометре.

В целях регистрации цветовых реакций ИФА используют специальные автоматизированные иммуноферментные анализаторы (ридеры), которые основаны на принципе спектрофотометрии. Анализ проводят при помощи компьютерных программ, которые позволяют подсчитывать оптическую плотность в каждой лунке и калибровать ее по отношению к контрольным образцам.

За титр испытуемой сыворотки принимают последнее наибольшее разведение сыворотки, превышающее в два раза интенсивность «негативного» контроля. Обычно положительная проба имеет желто-коричневую окраску различной интенсивности, в отличие от бесцветной или слегка желтоватой «негативного» контроля. Реакцию можно оценивать как визуально, так и инструментально на фотометре при длине волны 450 нм. Результаты выражают в единицах оптической плотности (ОП); за положительный результат принимают то разведение нетитруемой сыворотки, которое дает превышение оптической плотности «негативного» контроля в диагностическом титре 1:500 в 2 и более раз.

Тесты ИФА можно интерпретировать как положительные (высоко-реактивные), отрицательные (нереактивные) и неопределенные (частично реактивные).

В связи с вероятностью ложно-положительных реакций, рекомендуют проводить дополнительный тест, подтверждающий положительные реакции при помощи иммуноблота.

Необходимые оборудование и реагенты:

- Термошейкер
- Вошер для промывания планшет
- Ридер для считывания плашек
- Дозаторы и наконечники
- Пробирки центрифужные конические
- Планшеты для ИФА
- Фосфатно-солевой буферный раствор (PBS)
- Казеин
- Твин-20
- Рекомбинантный специфический белок (АГ)
- Конъюгат, меченный ферментом
- Субстрат ТМБ

### **Иммуноблоттинг**

На сегодняшний день стандартной процедурой лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции является обнаружение антител к ВИЧ с последующим подтверждением их специфичности в реакции иммунного блоттинга.

Тест основан на принципе непрямого ИФА. Принцип этого метода заключается в выявлении антител к определенным белкам вируса (антигенам). Антигены фиксированы на специальной мембране, на которую помещают исследуемую сыворотку. О наличии антител к определенному антигену ВИЧ судят по появлению окрашенной полосы на участке мембраны, где локализован данный антиген.

Результаты ИБ оценивают в соответствии со следующими критериями:

- положительный – если на мембране видны полосы, соответствующие любым двум или трем гликопротеидам ВИЧ (gp41, gp120, gp160);

ВИЧ-положительные результаты

gp160

gp110/120

p68

p55

p52

gp41

p40

p34

p25

p18

контроль

- отрицательный – не обнаруживаются антитела ни к одному из антигенов ВИЧ;
- если результат ИБ нельзя расценить как положительный или отрицательный, его считают неопределенным. Сомнительный результат: есть только лишь белок p25 и белок gp160. Такой результат может быть получен при обследовании ВИЧ-инфицированных пациентов, у которых гуморальный иммунный ответ на вирус находится на ранней стадии развития. В связи с этим при получении неопределенного результата иммуноблоттинг обязательно повторяют, а также проводят исследования методами, направленными на выявление компонентов самого вируса, поскольку эти методы позволяют подтвердить диагноз ВИЧ-инфекции на самых ранних стадиях заболевания.

#### **Методика постановки иммуноблоттинга на стрипах из иммуноблот тест-системы «New-Lav-Blot» с использованием конъюгата со щелочной фосфатазой**

Согласно инструкции, стрипы из тест-системы «New-Lav-Blot» помещают в индивидуальные углубления планшета для иммуноблота. После смачивания стрипов в разведенном промывочном растворе в течении 5 минут, к ним добавляют по 20 мкл контрольных и анализируемых сывороток.

В качестве контроля, к первым двум стрипам прибавляют человеческую отрицательную и человеческую положительную сыворотки из набора.

К остальным стрипам – сыворотку от добровольцев, вакцинированных против ВИЧ-1.

Инкубируют 2 часа при покачивании на планшетном шейкере при комнатной температуре (18-30 °С).

Далее промывку стрипов проводят 3-кратно разведенным промывочным буфером.

Вносят по 2 мл на каждый стрип конъюгат из набора. Инкубируют 1 час при покачивании на планшетном шейкере при комнатной температуре (18-30 °С).

Промывку стрипов проводят 3-кратно разведенным промывочным буфером.

Вносят на каждый стрип по 2 мл субстратного раствора из набора. Инкубируют при медленном покачивании на планшетном шейкере при комнатной температуре (18-30 °С), наблюдая за развитием окрашивания. Все полосы, соответствующие вирусным белкам, должны проявляться на стрипе в ячейке с положительной контрольной сывороткой. (время развития окраски – около 5 минут).

Для остановки реакции удаляют субстратный раствор и промывают стрипы не менее 3 раз дистиллированной водой.

Высушивают стрипы между двумя листами фильтровальной бумаги при комнатной температуре.

Интерпретация результатов

Подтверждение правильности результатов:

Полоса, содержащая антитела к IgG (внутренний контроль), должна быть ярко окрашенной. Это говорит о том, что внесение сывороток и реагентов, а также протокол анализа были выполнены правильно. Отсутствие полосы внутреннего контроля или недостаточная интенсивность ее окраски указывает на ошибку внесения образцов или реагентов или на ошибку в выполнении протокола исследования.

Положительный контроль:

На стрипе с положительной контрольной сывороткой присутствуют полосы ко всем основным белкам ВИЧ-1 и полосы внутреннего контроля.

Отрицательный контроль:

На стрипе с отрицательной контрольной сывороткой полосы, соответствующие вирусным белкам, отсутствуют. Присутствует только полоса внутреннего контроля.

Оценка полученных результатов:

Присутствие антител к белковым компонентам ВИЧ-1, определяется по наличию на стрипах специфических окрашенных полос (фиолетово-голубые). Их расположение на стрипе соответствует молекулярной массе вирусных белков.

Необходимые оборудование и реагенты:

- Шейкер
- Дозаторы и наконечники
- Пробирки центрифужные конические
- Реактивы из набора

## **ВИРУСНЕЙТРАЛИЗАЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПАНЕЛИ ПСЕВДОВИРУСОВ**

### **Сравнительный анализ трех методов измерения нейтрализации ВИЧ-1**

Наличие нейтрализации ВИЧ-1 сыворотками вакцинированных пациентов обычно считается достаточным основанием для подтверждения индукции протективного противовирусного иммунного ответа. Платформы нейтрализации ВИЧ развиваются более двух десятилетий. В исследовательских и контрольных лабораториях мира разрабатываются панели вирусологических и серологических реагентов, выделенных от ВИЧ-положительных пациентов так, чтобы моделировать исключительное генетическое разнообразие ВИЧ. В большинстве методов вирус и антитела инкубируются вместе, а затем добавляются к CD4<sup>+</sup> клеткам-мишеням. Наиболее ранние методы нейтрализации ВИЧ зависели от способности вируса, адаптированного к Т-клеточной линии, инфицировать эту линию, или производить детектируемые вирусные белки, или формировать гигантские клетки (синцитии), что в конечном итоге можно было количественно выразить как меру уменьшения инфекции под воздействием антител. В целом, нейтрализация вирусов, адаптированных к культуре Т-клеток, очень плохо предсказывала нейтрализующие свойства первичных ВИЧ изолятов. Поэтому были разработаны методы, в которых вирус от ВИЧ-инфицированных пациентов использовали для инфицирования мононуклеарных клеток периферической крови ВИЧ-серонегативных доноров в предположении, что этот способ является более физиологичным.

Такие первичные клетки получали от разных доноров, использовали свежeweыделенными или после замораживания, после стимуляции фитогемагглютинином и культивировали в присутствии ИЛ-2 перед инфицированием вирусом. Понятно, что мононуклеары, выделенные от разных доноров, проявляли разную чувствительность к ВИЧ инфицированию. Отличие в способности реплицировать ВИЧ-1 можно объяснить как генетическими, так и CD8<sup>+</sup> факторами клетки-хозяина, количеством CD4<sup>+</sup> клеток или

уровнем экспрессии молекул CD4 на клетках, влиянием других молекул клетки на поверхность вируса и генетическим полиморфизмом хемокинов и хемокиновых рецепторов, таких, как CCR5, которые являются корецепторами для ВИЧ-1. Из-за наличия такого огромного количества переменных было весьма проблематично получать повторяющиеся результаты нейтрализации на мононуклеарных клетках крови не только между разными лабораториями, но даже внутри одной лаборатории при проведении разных экспериментов.

Стандартизованный метод измерения нейтрализующих антител для испытания вакцин против ВИЧ был предложен в 2005 году в результате совещания Комитета Лабораторной Стандартизации при Глобальном центре по разработке вакцины ВИЧ/СПИД (GHAVE) (Mascola et al., 2005). Такая стандартизация подходов к измерению функций антител, индуцированных вакциной, отражена в методологии, которая продолжает изучаться и совершенствоваться исследователями из Консорциума по всестороннему иммунологическому мониторингу антител, индуцированных ВИЧ-вакцинами (CA-VIMC). Центральная лаборатория этого консорциума, руководима проф. Д. Монтефиори, располагается в Медицинском центре Университета Дьюка и финансируется фондом Билла и Мелинды Гейтс, что указывает на чрезвычайную значимость разрабатываемой методологии. В 2007 году совещание по «Гуморальному иммунному ответу на ВИЧ и подходам к разработке антигенов, которые индуцируют нейтрализующие антитела и другие потенциально протективные антитела», спонсированное GHAVE, подтвердило мнение участников ВОЗ и Европейской комиссии по изучению ВИЧ-вакцин, что достигнут существенно новый технологический уровень для обеспечения измерений антител, индуцированных ВИЧ-вакцинами (Montefiori et al., 2007). В соответствии с рекомендациями Глобального центра по ВИЧ-вакцинам, громоздкий и дорогостоящий метод измерения нейтрализации ВИЧ с помощью лимфоцитов периферической крови и неклонированных вирусных изолятов заменяется новой технологией псевдотипированных вирусов с использованием генноинженерных линий клеток. Этот новый технологический подход использует так называемые «псевдовirusы», которые представляют собой молекулярно клонированные оболочечные белки ВИЧ-1, внедренные в дефектные вирусные частицы, способные только к одному раунду инфекции. Такие псевдовirusы получают в культуре клеток 293Т при котрансфекции плазмидой, несущей полный геном ВИЧ с делетированным Env-геном оболочечных белков, и плазмидой, несущей необходимый Env-ген оболочечных белков (рис. 1). Последняя плаزمида может быть заменена на любой молекулярный env клон, выделенный из разных вариантов ВИЧ, что позволяет изучать практически все антигенное разнообразие ВИЧ. Псевдовirusы способны инфицировать любые клетки, экспрессирующие необходимые рецепторы. В частности, в одном из наиболее распространенных методов используется клеточная линия TZM-bl, полученная из эпителиальной линии HeLa в результате генно-инженерных модификаций. Линия TZM-bl несет репортерный ген люциферазы, который активируется в присутствии Tat-белка ВИЧ. Метод, использующий псевдовirusы и культуру клеток TZM-bl, представляет собой наиболее передовой, допускающий передачу между лабораториями, метод для измерения вируснейтрализующих антител в условиях надлежащей клинико-лабораторной практики (GCLP).

Эта новая технология дает большую чувствительность, воспроизводимость и производительность при минимальных затратах и максимальной научной значимости полученных результатов по сравнению с методами, основанными на использовании лимфоцитов периферической крови и неклонированных вирусных изолятов. Широкое применение технологии псевдовirusов привело к «взрывному» потоку новых данных, невозможных ранее. Фонд Сотрудничества по разработке вакцины против СПИД (CAVD) предпринимает шаги по распространению этой новой технологии во многие лаборатории во всем мире и по обеспечению валидированными программами профессионального тестирова-

ния эквивалентности проведения измерений ВИЧ-нейтрализации в разных лабораториях» (Global HIV vaccine enterprise. Report of Activities 2005–2007).

Комитет ВОЗ/ООН по ВИЧ-вакцине совместно с ЕС поддерживали проект по сравнительному изучению и стандартизации различных методов ВИЧ-нейтрализации. 18 независимых лабораторий сравнивали различные методы, использующие неклонированные вирусы, наработанные в мононуклеарных клетках периферической крови (метод инфекционности вируса) и их Env-псевдотипированные (по gp160) дериваты, полученные в клетках 293Т (метод псевдовирусов). В результате исследований показано, что метод Env-псевдовирусов является гораздо более чувствительным, чем метод ВИЧ-инфекционности. Согласованность результатов между разными лабораториями была существенно лучше для метода псевдовирусов, чем для метода инфекционности с неклонированными вирусами. Для ряда вирусов согласованность результатов между лабораториями была ограниченной и зависела как от вируса, так и от реагента, используемого для нейтрализации (Fenyo et al., 2009).

В настоящее время в связи с большей простотой, производительностью, дешевизной, безопасностью и воспроизводимостью результатов измерений в лабораториях мира широко распространен метод измерения ВИЧ-нейтрализующих сывороток с применением молекулярно клонированных Env-псевдотипированных вирусов на культуре клеток TZM-bl, в которой в результате инфицирования ВИЧ начинается экспрессия репортерного гена люциферазы, и учет вирусной инфекционности проводится по величине люминесценции инфицированной культуры клеток.

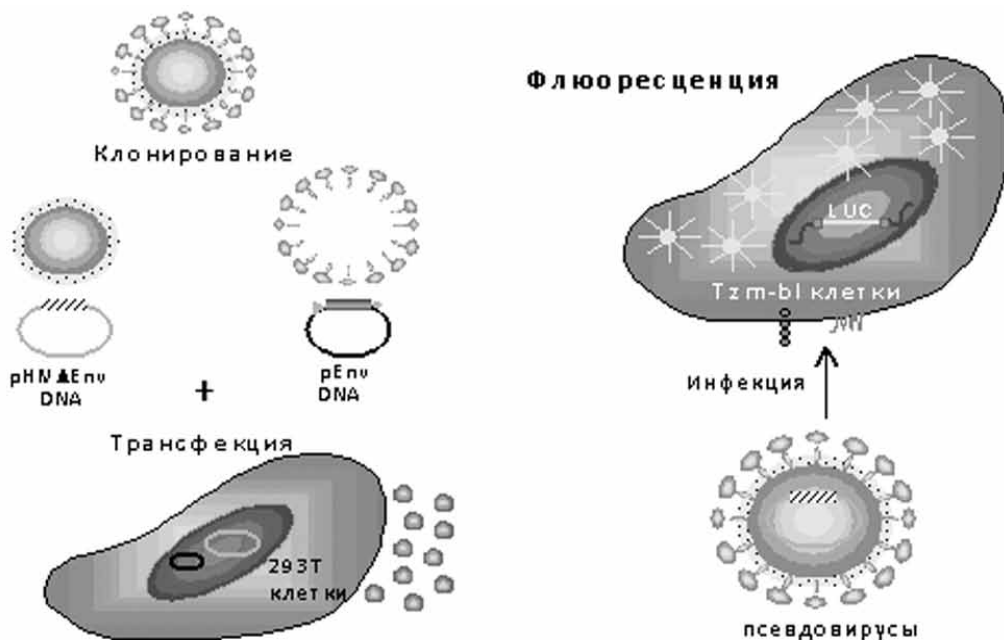


Рисунок 1. Принцип получения и инфицирования клетки Env-клоном псевдовируса. Плазмиды, несущая полный набор генов ВИЧ-1 кроме гена env оболочечных белков, и плазмиды, несущая гены env оболочечных белков gp120 и gp41 ВИЧ-1, используются для котрансфекции клеток 293Т, в результате образуются псевдовирусные частицы со свойствами ВИЧ-1, способные инфицировать клетку-мишень, но не способные дать вирусное потомство, поскольку псевдовирус содержит неполный вирусный геном. Полученная методами генной инженерии культура клеток TZM-bl, производная от культуры HeL

*Сравнительные характеристики  
трех методов измерения нейтрализации ВИЧ-1*

Сравниваемый показатель	Первичные лимфоциты периферической крови	Перевиваемые линии Т-лимфоцитов	Культура клеток TZM-bl
Тип клеток	Первичные лимфоциты периферической крови	Неопластические CD4+ Т-клетки	Эпителиальные клетки HeLa
Вирус	Первичный неклонированный	Адаптированный к Т-клеткам вариант	<ul style="list-style-type: none"> <li>• псевдовирус</li> <li>• первичный неклонированный</li> </ul>
Продолжительность измерения	4-6 дней	5-7 дней	2-3 дня
Регистрация результата	<ul style="list-style-type: none"> <li>• антиген p24</li> <li>• обратная транскриптаза</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синцитий</li> <li>• БОЕ</li> <li>• ЦПД</li> <li>• антиген p24</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Активность люциферазы</li> <li>• грин-флюоресцеин белка</li> <li>• щелочной фосфатазы</li> <li>• бета-галактозидазы</li> </ul>
Количество инфекционных циклов	Множество	Множество	Только один
Способность измерять ингибирование	Да	Да	Да
<ul style="list-style-type: none"> <li>• прикрепления/ проликования</li> <li>• межклеточной инфекции</li> </ul>	Да	Да	Нет
Используемые корецепторы	CCR5, CXCR4 и другие (CCR5 наиболее физиологичен)	CXCR4	CCR5, CXCR4 (100 кратное превышение поверхностной концентрации CCR5 над лимфоцитами)

В таблице 1 приведены сравнительные характеристики метода измерения ВИЧ-нейтрализации с помощью неклонированных изолятов, многократно пассированных на мнуклеарных клетках периферической крови с технологическим подходом псевдовирусов. Из приведенного сравнения видно, что система псевдовирусов имеет некоторые преимущества как платформа, которая позволяет быстро измерять наличие ВИЧ-нейтрализующих антител против вирусных частиц, несущих оболочечные белки, свойственные начальному этапу инфицирования человека. Технология псевдовирусов позволяет работать с вирусными частицами из множества вирусных субтипов, обеспечивает высокий уровень воспроизводимости и производительности, использует простые и безопасные реагенты, которые можно распространять по всему миру в виде диагностических наборов, и, что очень важно для контрольных лабораторий, может быть валидирована.

К сожалению, имеются существенные несоответствия результатов, полученных методом псевдовирусов, по сравнению с методом неклонированных вариантов ВИЧ на культуре первичных мононуклеарных клеток. Так, широко нейтрализующее моноклональное антитело 4E10 в псевдовиральной системе проявляет среднюю нейтрализующую активность на мононуклеарных клетках периферической крови (Binley et al., 2004). Напротив, ряд других моноклональных широко нейтрализующих антител, проявляя явную

нейтрализацию на клетках крови, не демонстрируют таковой в системе псевдовирюсов (Choudhry et al., 2007). В сравнительных тестах примерно от 40% до 80% значений титра ВИЧ-нейтрализующих антител, измеренных этими двумя методами, не коррелируют (V.R. Polonis et al., 2008).

Предполагается, что первичные лимфоциты крови являются наиболее приближенной моделью к условиям *in vivo* для ВИЧ, однако митогенная стимуляция лимфобластов, необходимая для их культивирования, совершенно не типична для тканей или циркулирующих Т-клеток. Метод, использующий первичные клетки крови, включает множество неконтролируемых циклов вирусной репликации как при культивировании модельных вирусных штаммов, так и при постановке самой реакции нейтрализации, что приводит к селекции изолированного *in vivo* набора вирусных вариантов в сторону вирусных вариантов, адаптированных к *in vitro* условиям.

Инфекционность вируса зависит от его способности связываться с клеткой-мишенью, характеризуемой прежде всего аффинностью лиганд-рецепторного взаимодействия оболочечных белков вируса и клеточного мембранного рецептора (Варфоломеев и Гуревич, 1999). Зависимость инфекционности вириона от аффинности его связывания с клеткой имеет вид колоколообразной кривой в случае наличия противовирусной иммунной реакции, а положение максимума этого колокола зависит от уровня реакции клетки или организма. На рисунке 2 приведена иллюстрация того факта, как вирионы с различным фенотипом (аффинностью) связывания с клеткой-мишенью различаются по способности вызвать продуктивную инфекцию в клетке. Из рисунка очевидно, что наиболее инфекционный фенотип вируса *in vivo* не проявляет максимальной инфекционности *in vitro*. В результате селекции на культуре клеток в вирусной популяции, выделенной из инфицированного организма, начинает преобладать фенотип с высокой инфекционностью *in vitro*, но низкой инфекционностью *in vivo*, т.е. тот фенотип, который крайне редко встречается в организме. Таким образом, адаптация вариантов ВИЧ-1 в культуре клеток приводит к изменению фенотипа оболочечных белков вируса по способности связываться с клеткой-мишенью.

Следует отметить, что аффинность лиганд-рецепторного взаимодействия биологических молекул на 60-70% определяется межмолекулярными электростатическими взаимодействиями. В этой связи теоретические результаты, представленные на рисунке 2, имеют клиническое подтверждение при изучении свойств вирусных изолятов ВИЧ-1, выделенных от одного пациента на разных стадиях ВИЧ-инфекции (Repits et al., 2008). Авторы

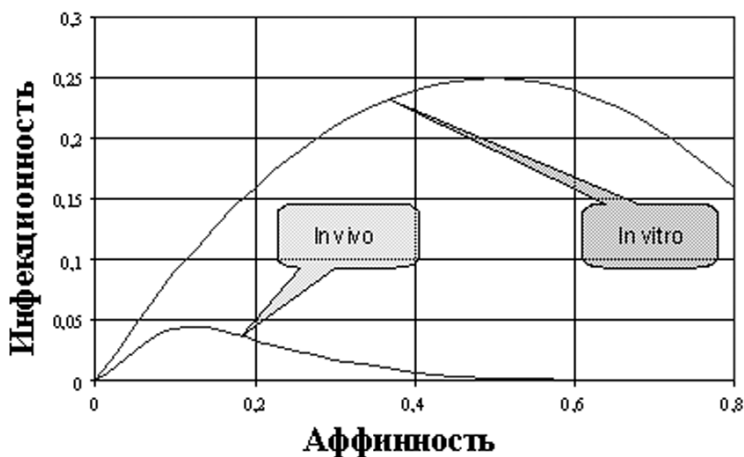


Рисунок 2. Зависимость инфекционности вируса от аффинности связывания вириона с клеткой для двух уровней противовирусной реакции

экспериментально показали, что зависимость инфекционности Env-клонов в культуре клеток и их устойчивость к ингибиторам проникновения пропорциональны величине поверхностного электростатического заряда гликопротеина gp120, что главным образом определяет связывание вириона с клеткой. Напротив, для CD4<sup>+</sup> лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированного пациента наблюдается обратная корреляция их концентрации с величиной поверхностного заряда оболочечных белков Env-клонов ВИЧ-1, выделенных из крови этого пациента. Это означает, что в результате ослабления иммунной реакции пациента в нем развиваются варианты вируса с большим зарядом оболочечных белков, способные связываться с клеткой-мишенью с большей аффинностью, что соответствует появлению более «агрессивных» инфекционных форм вирионов. Для того чтобы при *in vitro* культивировании ВИЧ-1, используемого для постановки реакции вирусной нейтрализации, избежать изменения поверхностных свойств вириона по фенотипическому признаку «аффинность связывания с клеткой-мишенью», следует при выделении из клинических образцов генов оболочечных белков ВИЧ-1 применять методологию амплификации из одного генома (single genome amplification of env gene), которая позволяет получать Env-клоны, наиболее инфекционные *in vivo*, и обеспечивает сохранение такого фенотипа псевдовиральных клонов, который наиболее часто встречается в инфицированном организме.

Метод псевдовиралов на TZM-bl культуре клеток поддерживает только однократное инфицирование клетки, регистрируя нейтрализацию на этапе вирусного проникновения в клетку. Другое существенное отличие систем измерения ВИЧ-нейтрализации лежит в механизме вирус-клеточного взаимодействия. Как правило, *in vivo* или в системе *in vitro* на первичных лимфоцитах периферической крови ВИЧ-1 проникает в клетку после взаимодействия с мембранным рецептором CD4 с последующим слиянием мембран вируса и клетки при участии хемокинового корецептора без эндосомального поглощения вируса. Клетки TZM-bl являются дериватом клеток HeLa, для которых характерно проникновение вируса путем рецептор обусловленного эндоцитоза (Marechal et al., 1998). Инфицирование TZM-bl клеток обычно происходит в присутствии DEAE декстрана, в этом случае, если эндоцитоз играет существенную роль в проникновении вируса в клетки TZM-bl, это соединение усиливает продуктивную инфекцию, обеспечивая буферную емкость внутри эндосомы и позволяя псевдовirusу избежать лизосомальной деградации и способствуя проникновению вируса в клетку посредством эндоцитоза.

Наконец, в-третьих, клетки TZM-bl экспрессируют существенно большее, примерно в 100 раз, количество поверхностных корецепторов CCR5 по сравнению с лимфоцитами периферической крови, экспрессия рецепторов CD4 на обоих типах клеток примерно одинаковая. Соотношение CD4:CCR5 является наиболее критичным в кинетике вирусного проникновения в клетку, определяя эффективность вирусной нейтрализации. Клетки, несущие большее количество корецепторов, имеют большую вероятность быть инфицированными, и следовательно они менее чувствительны к нейтрализующему действию антител, т.е. измерение уровня нейтрализующих антител на культуре клеток TZM-bl проводится в более жестких условиях.

Приведенные выше сравнительные характеристики методов измерения уровня ВИЧ-нейтрализующих антител демонстрируют ряд технологических преимуществ метода с использованием псевдовиралов ВИЧ-1 на TZM-bl клетках как метода, позволяющего:

- проводить стандартизацию измерений между разными лабораториями;
- проводить измерения в условиях минимальной биологической защиты с неинфекционными псевдовиральными частицами;
- исключить антигенную изменчивость и селекцию адаптированных к культуре штаммов ВИЧ-1 в процессе их культивирования *in vitro*;
- обеспечить высокую скорость проведения экспериментов с высокой точностью измерения титров антител;
- обеспечить высокую воспроизводимость метода и возможность его валидации в соответствии с требованиями GCLP для клинических испытаний.



## **Антигенное разнообразие ВИЧ-1 и панели Env-псевдотипированных клонов псевдовирусов**

Основная проблема создания анти-ВИЧ-вакцины – высочайшее генетическое и антигенное разнообразие ВИЧ-1 (Gao et al., 1998; Mascola et al., 2001; Trkola et al., 1995). Вакцина против ВИЧ-1, чтобы быть эффективной, должна индуцировать антитела, нейтрализующие генетически и антигенно разные вирусы. При постановке реакции нейтрализации необходимо использовать множество вирусных штаммов, чтобы подтвердить широкий антигенный ответ нейтрализующих антител. В настоящее время при поддержке Глобального центра по ВИЧ-вакцине сформированы стандартные панели псевдовирусов для большинства вирусных субтипов, включая субтипы А, В и С. Такие панели покрывают антигенное разнообразие вариантов вируса внутри одного субтипа. Для обеспечения разнообразной чувствительности клонов панели к нейтрализации проводится отбор вирусных вариантов по их взаимодействию с ВИЧ-нейтрализующими моноклональными и поликлональными антителами. Будучи распространяемыми по лабораториям мира, такие стандартные панели Env-псевдотипированных клонов псевдовирусов могут обеспечить GLP-валидацию и позволят проводить сравнение новых иммуногенов и установить приоритет кандидатных вакцин при проведении клинических испытаний. Также результаты измерения с помощью стандартной панели псевдовирусов позволяют понять пути улучшения иммуногена.

Сколько же вирусных изолятов следует включить в состав стандартной панели псевдовирусов? Статистическая оценка этого количества зависит от нескольких факторов, таких, как вариабельность уровней нейтрализации между вакцинированными добровольцами, корреляция уровня нейтрализации для разных изолятов, но для одного и того же вакцинированного добровольца. Например, если взять панель из 12 вирусов для сравнения двух кандидатных вакцин на 20 добровольцах при мощности 90% критерия различения ответа антител, то можно отличить 10-процентную разницу в нейтрализации вирусов антителами, индуцированными одной вакциной от соответствующего ответа на другую вакцину или плацебо.

Измерение уровня нейтрализующих антител следует проводить в три этапа, постепенно усиливая критерии отбора вакцинных кандидатов. На первом этапе клинических испытаний ВИЧ-вакцины следует обращать внимание на минимальную способность вакцины вызывать ответ нейтрализующих антител. При этом вакцину следует тестировать против минимального набора вирусов, а сами вирусы должны быть высоко чувствительны к антительной нейтрализации. Примером такого вируса являются изолят SF162 и соответствующий ему клон псевдовируса. В качестве другого вирусного штамма, используемого для оценки вакцины на первом этапе тестирования, следует выбрать устойчивый к нейтрализации клон того субтипа ВИЧ-1, который соответствует применяемой вакцине, что позволит оценить диапазон широты реакции индуцированных нейтрализующих антител. На втором этапе тестирования сывороток иммунизированных добровольцев следует обеспечить более углубленное изучение широты нейтрализующих свойств антител. Для этого используется панель из 12 вирусов, являющихся представителями генетического субтипа ВИЧ-1, соответствующего субтипу разрабатываемой вакцины. На третьем этапе изучения индуцированной вакцинацией ВИЧ-нейтрализации следует использовать панели по 6 вирусов каждого из 6-ти основных субтипов ВИЧ-1, а также следует добавить вирусы генетического субтипа того региона, в котором планируется проводить 3-ю фазу клинических испытаний (Mascola et al., 2005).

Между участниками Глобального центра по разработке ВИЧ-вакцины достигнуто соглашение, что молекулярные клоны вирусов, такие, как Env-псевдовирусы, имеют существенные преимущества при проведении испытаний, поскольку плазмидные Env-клоны представляют собой стабильные и хорошо охарактеризованные реагенты с известной последовательностью. Использование плазмид экспрессии для получения Env-псевдовирусов обеспечивает большую уверенность в генетическом подобии вирус-

ных наработок, что позволяет проводить воспроизводимые и точные измерения. Более того, использование псевдовирюсов с известной последовательностью генов оболочечных белков позволяет картировать специфичность нейтрализующих антител, что важно для совершенствования дизайна последующих вакцинных конструкций. Наконец, когда панель функциональных Env-плазмид уже охарактеризована и собрана, то потребуются минимальные затраты времени и сил для наработки рабочих серий псевдовирюсов по сравнению с наработкой и характеризацией неклонированных вирусов в донорских лимфоцитах периферической крови (Mascola et al., 2005).

### Характеристики набора реагентов для реакции нейтрализации с использованием Env-псевдотипированных клонов псевдовирюсов ВИЧ-1

На самом начальном уровне испытания новой вакцины необходимо быть крайне внимательным и осторожным, чтобы не отказаться от перспективного иммуногена и быть способным измерить минимальные вируснейтрализующие свойства антител, индуцируемых кандидатной вакциной. Для этого сыворотка крови вакцинированных добровольцев должна быть протестирована против гомологичного вирусного штамма, или если такового нет, то против штамма с известной высокой чувствительностью к антителной вирусной нейтрализации. Наиболее известным представителем такого типа псевдовирюсов является Env-псевдотипированный клон pCAGGS SF162 gp160 ARP2125 (NIH10463), субтип В, для которого на культуре клеток TZM-bl для панели моноклональных антител Тримаб определена  $ID_{50}=0,06$  мг/мл. Такое первичное тестирование наличия минимального нейтрализующего эффекта также представляет интерес на этапе дизайна вакцинных иммуногенов. Напротив, наличие высокого потенциала вируснейтрализации выявляется с помощью клонов, которые слабо чувствительны к нейтрализующему действию панели моноклональных антител Тримаб. В стандартной панели псевдовирюсов ВИЧ-1 субтипа В к этому классу относится клон 4, PVO, (SVPB11), полученный из вирусного изолята, выделенного из лимфоцитов периферической крови пациента с высокой вирусной нагрузкой в 1996 году в Италии. Клон слабо нейтрализуется широкореактивными моноклональными антителами 2F5, 4E10 и b12, но чувствителен к действию антитела 2G12.

На этапе первичного скрининга сывороток достаточно использовать всего два клона псевдовирюсов с высокой и низкой чувствительностью к нейтрализации, а именно, клон SF162 LS и клон PVO4.

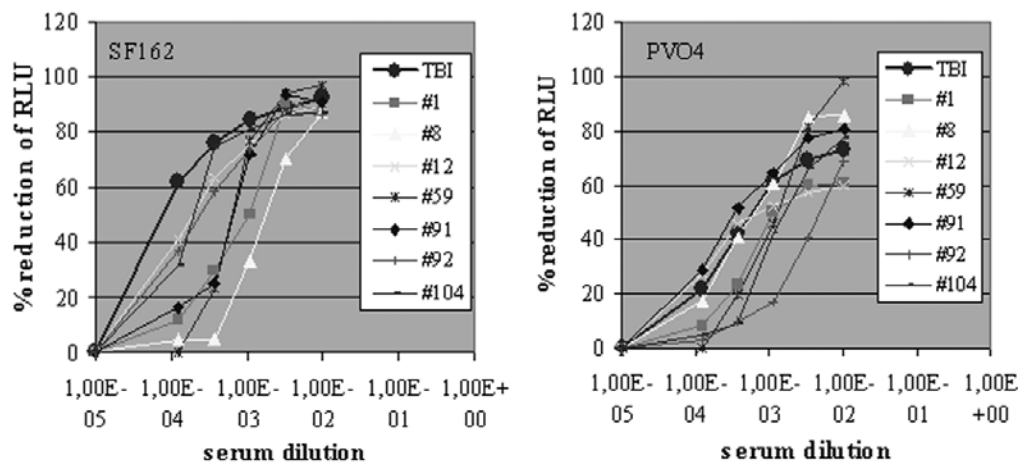


Рисунок 3. Нейтрализация клонов SF162 и PVO4 псевдовирюсов сыворотками ВИЧ-инфицированных пациентов на культуре клеток TZM-bl

Скрининг нейтрализующей активности 108 сывороток, выделенных из крови ВИЧ-инфицированных пациентов на территории РФ, позволил выявить лишь 7 образцов с достаточной вируснейтрализующей активностью. На рисунке 3 приведены результаты измерения уровня вирусной нейтрализации для этих сывороток в сравнении с иммунной сывороткой мыши, полученной после 4-кратной иммунизации белком ТВИ, основным антигенным компонентом вакцины КомбиВИЧвак, индуцирующим ВИЧ-нейтрализующие антитела. Из рисунка 3 видно, что 50-процентное ингибирование псевдовиральной инфекции, вызванной клоном SF162, ТВИ иммунной сывороткой мыши достигается при разведении сыворотки 1:30000, близкую активность проявляют сыворотки №№ 12, 92 и 104, выделенные от ВИЧ-инфицированных пациентов, не получавших антиретровирусную терапию. Другая группа сывороток №№ 1, 8, 59, 91 проявляет на порядок меньшую нейтрализующую активность в диапазоне разведений 1:3000–1:1000, обеспечивающих 50-процентную нейтрализацию. Эти сыворотки были получены от ВИЧ-инфицированных пациентов, получавших антиретровирусную терапию. Постановка реакции нейтрализации с применением клона PVO4 демонстрирует ослабление вирусной нейтрализации всеми сыворотками примерно в 10 раз. Титр в реакции нейтрализации для сыворотки крови мыши, иммунизированной белком ТВИ, в этом случае приблизительно равен 1:3000, средний уровень нейтрализации разведением сывороток 1:100 составляет 70%, тогда как для клона SF162 LS эта величина составляет 90%.

Таким образом, кривые нейтрализации Env-клонов SF162 и PVO4 на культуре клеток TZM-bl показывают, что сыворотки ВИЧ-инфицированных пациентов имеют широкий диапазон нейтрализации, и некоторые из них могут быть рекомендованы для включения в набор реагентов в качестве положительных и отрицательных контролей для стандартизации измерения вирус-нейтрализующего ответа на кандидатные ВИЧ-вакцины.

В таблице 2 приведены сводные характеристики некоторых ВИЧ-нейтрализующих сывороток.

Таблица 2

Характеристики некоторых ВИЧ-нейтрализующих сывороток							
№	CD-4	РНК-ВИЧ	ВААРТ	Титр 50-процентной нейтрализации клона SF162	Титр 50-процентной нейтрализации клона PVO4	Титр в ИФА против ТВИ	Титр в ИФА против gp120
12	577	<400	+	1:5400	1:900	1:6400	1:1640000
59	462	Не обнаруж.	+	1:1800	1:600	1:12800	1:820000
90	848	3260		<1:100	<1:100	1:3200	1:205000
91	561	<400	+	1:1800	1:2700	1:3200	1:1640000
92	675	6290		1:5400	1:200	1:6400	1:3280000
104	536	8610		1:5400	1:600	1:3200	1:1640000

Данные таблицы демонстрируют, что не все сыворотки с высокими значениями титра антител, измеренного в ИФА против антигенов оболочечных белков ВИЧ, проявляют способность нейтрализовать ВИЧ-1. Так, сыворотка №90 является положительной по ВИЧ-1 по результатам измерения в ИФА, но не проявляет ВИЧ-нейтрализующих свойств. Такие сыворотки могут служить отрицательным контролем при постановке реакции нейтрализации ВИЧ-1.

Таким образом, псевдовиральные Env-клоны SF162 и PVO4, а также сыворотки К<sup>+</sup> и К<sup>-</sup> (табл. 2) могут применяться при оценке эффективности кандидатных вакцин против ВИЧ-1 и разработке новых вакцин. Набор этих реагентов позволяет измерять ней-

трализацию ВИЧ-1 по изменению уровня люминесценции культур клеток TZM-bl в результате вирусной инфекции. Клетки TZM-bl чувствительны к инфицированию широким разнообразием ВИЧ штаммов, включая первичные изоляты ВИЧ и молекулярно клонированные Env-псевдотипированные вирусы. Набор реагентов для реакции нейтрализации ВИЧ-1 предназначен для измерения ВИЧ-нейтрализующего ответа антител, полученных в результате экспериментальной вакцинации лабораторных животных, вакцинации добровольцев или в результате ВИЧ-инфекции.

**Метод *ex vivo* стимуляции клеток цельной крови и его применение  
для количественной оценки напряженности поствакцинального клеточного  
иммунитета против ВИЧ-1**

Защита организма от вирусной инфекции зависит не только от уровня нейтрализующих антител в крови пациента, но и от наличия клеток иммунологической памяти. Поэтому очевидно, что для оценки напряженности поствакцинального иммунитета необходимо оценивать как его гуморальную, так и клеточную составляющую. Для исследования функциональной активности клеточного иммунитета используют кожные тесты, реакцию бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ), а также иммуноферментный анализ в тесте ELISpot (enzymelinked immunosorbent spot assay), позволяющий количественно определить число антигенспецифичных Т-клеток. Метод проточной цитометрии прекрасно справляется с подсчетом клеток различной специфичности, но не способен дать оценку функциональной активности этих клеток. Применение РБТЛ и кожных тестов ограничено из-за большого количества неспецифических реакций, низкой сходимостью результатов, полученных разными группами исследователей, и длительности анализа. ELISpot мало доступен из-за высокой стоимости анализа и сложности интерпретации результатов.

Метод анализа цельной крови, стимулированной *ex vivo*, впервые описанный в 1982 году (Kirchner et al., 1982), нашел применение для двух основных приложений при оценке клеточных иммунных реакций. Первое из них связано с определением уровня цитокинов при заболевании или при фармакологической оценке соединений (Heagy et al., 2000; Van der Linden et al., 1998). Было показано, что изменение профиля цитокинов позволяет прогнозировать клинический исход заболевания (Mira et al., 1999; Hyjek et al., 1995; Sousa et al., 1998; Pinto et al., 2006; Noga et al., 2006). Измерение продукции цитокинов может служить важным биомаркером для идентификации различных заболеваний и для контроля эффективности лечения или вакцинации. Модели цитокинов цельной крови использовались в фармакологических исследованиях *in vitro* и *ex vivo* и были распространены на иммунотоксикологические тестирования потенциала иммуностимуляторов и иммунодепрессантов (Langezaal et al., 2002). Культивирование клеток цельной крови является идеальным методом *ex vivo* для анализа секреции цитокинов в контролируемой среде и показывает возможность исследования биологического действия иммуномодуляторов на уровень Th1 и Th2 цитокинов.

Второе приложение метода *ex vivo* стимуляции клеток цельной крови обеспечивает возможность изучать пролиферацию Т- и В-лимфоцитов цельной крови, *ex vivo* индуцированную антигенами или митогенами. Метод применяется для оценки ответа лимфоцитов при иммуносупрессивной терапии (Magee et al., 2002).

*Ex vivo* стимуляция успешно используется для измерения активации иммунных клеток крови на уровне одной клетки, например, в методе ELISpot (Rodriguez-Caballero et al., 2004). Поскольку в этом случае необходимо изолировать соответствующие клетки иммунной системы, очевидно, что такое изолирование не всегда воспроизводит реальное физиологическое окружение иммунных клеток. Процедуры изоляции клеток для постановки ELISpot часто изменяют или каким-то образом влияют на клеточные ответы, на взаимодействие между различными типами клеток. Сама процедура изоляции клеток из цельной крови приводит к удалению компонентов плазмы и замещению их другими компонентами, которые могут оказать супрессивное или стимулирующее действие на

лимфоциты (Schindler et al., 2004). Метод *ex vivo* стимуляции клеток цельной крови позволяет преодолеть эти недостатки, более того, он позволяет проводить новые функциональные исследования. В частности, метод стимуляции клеток цельной крови применяли для исследования функции дендритных клеток, выделенных из периферической крови, для анализа функции толл-лайк рецепторов, при этом была устранена необходимость в длительных манипуляциях с потенциальной возможностью внесения артефактов (Ida et al., 2006). Помимо приложений с использованием свежей цельной крови возможно применение криоконсервации для проверки иммунных функций или обнаружения пирогенных контаминантов (Schindler и др., 2004). Показано, что замороженные образцы цельной крови сохраняли чувствительность и функциональность в отношении стимуляции цитокинов в ответ на воспалительные агенты (Schindler et al., 2004; Pinto et al., 2006). Такие криоконсервированные образцы могут служить в качестве стандарта или положительного контроля для мониторинга качества анализа. Кроме того, криоконсервация позволяет сохранять образцы крови пациентов для последующего анализа функции клеток. При мониторинге аналитов, таких как цитокины, с *ex vivo* стимуляцией, необходимо глубокое понимание вклада различных компонентов для анализа вариабельности, чтобы отличить статистически значимые различия в результате лечения. На надежность и точность анализа влияют такие факторы, как пол пациента, диеты, биоритмы, процедуры сбора проб, вид используемого консерванта, условия транспортировки образца и условия хранения, виды обработки и специфичность используемого анализа (Bonini et al., 2002). Эти переменные должны контролироваться таким образом, чтобы их воздействие можно было отличить от изменений, связанных с клинической эффективностью лечения (Ray et al., 2006). Было сообщено, что общая вариабельность метода лимфоцитов цельной крови много меньше, чем различия между донорами, что указывает на больший уровень достоверности контроля изменений состояния одного пациента по сравнению с усреднением анализируемых показателей от разных доноров.

Лимфоциты играют ключевую роль в функционировании иммунной системы. Они участвуют в реакциях как врожденного, так и приобретенного иммунитета, формируют защиту организма от инфекций, продуцируя антитела и координируя сигнальные пути иммунной системы. В-лимфоциты составляют примерно 5–15% от всего количества циркулирующих в крови лимфоцитов, а основная часть циркулирующих лимфоцитов представлена Т-клетками, доля которых составляет примерно 80%. Контакт лимфоцитов со стимулирующим агентом приводит к активации и экспансии соответствующей популяции. Стимулированные лимфоциты прежде всего усиливают синтез АТФ, затем начинается кластеризация поверхностных рецепторов, синтез РНК, продукция и секреция цитокинов, и наконец, удвоение ДНК (Paul et al., 2003). Мониторинг функциональной активности лимфоцитов необходим при различных заболеваниях, или применении различных лекарств, или операциях по трансплантации тканей, или при противоопухолевой терапии, ну и конечно, при разработке новых лекарств и вакцин для контроля эффективности и безопасности новых препаратов. Существует несколько проверенных временем методов оценки состояния иммунной системы, таких, как проточная цитометрия, ELISpot, реакция бласт-трансформации лимфоцитов (РБТЛ), тем не менее каждый из них имеет свои ограничения в применении и получаемых результатах (Keilholz et al., 2002). Относительно недавно описан подход по измерению ранних сигналов активации лимфоцитов, таких, как высвобождение АТФ (Sottong et al., 2000). Компания Cylex разработала наборы для измерения ранних маркеров пролиферации лимфоцитов, стимулированных антигенами и митогенами. Принцип методологии заключается в измерении уровня синтеза внутриклеточной АТФ в определенной популяции лимфоцитов, выделенной из стимулированной цельной крови с помощью магнитных частиц, покрытых определенными моноклональными антителами. Количество АТФ, присутствующее в стимулированной пробе крови, является мерой активации лимфоцитов на начальном этапе пролиферации (Prabhakar and Kelley, 2008).

Таким образом, метод *ex vivo* стимуляции цельной крови антигенами ВИЧ-1 обеспечивает:

- количественную оценку функционального состояния клеток;
- воспроизводимость измерений;
- простоту и быстроту анализа;
- относительную дешевизну.

Метод *ex vivo* стимуляции клеток цельной крови был адаптирован для измерения ВИЧ-специфического клеточного иммунного ответа. Были выбраны способ получения образцов, их транспортировки, обработки, а также состав субстанций, применяемых для стимуляции клеток, условия хранения супернатанта клеток крови, процедур измерения концентрации цитокинов и измерения пролиферации лимфоцитов. Метод *ex vivo* стимуляции клеток цельной крови позволяет проводить комбинированный анализ как пролиферативной активности лимфоцитов, так и уровня цитокинов, секретируемых этими же лимфоцитами.

Уровень цитокинов в супернатанте клеток крови измеряется в ИФА в 96-луночном планшетном формате. В качестве меры количественной оценки напряженности клеточного иммунитета нами был предложен цитокиновый индекс ( $I_{\text{цит}}$ ) – отношение антигенстимулированной к митогениндуцированной продукции цитокина. Известно, что вирусные антигены в организме человека помимо специфического иммунного ответа, который сопровождается продукцией цитокинов лимфоцитами, могут вызывать неспецифическую стимуляцию синтеза цитокинов. Эта митогенная составляющая компонента в цитокиновом ответе на антиген у людей варьирует в достаточно широком диапазоне и определяется потенциальной способностью клеток к продукции цитокинов. Цитокиновый индекс позволяет учитывать индивидуальные особенности иммунной реактивности каждого пациента. Также активация стимулированных лимфоцитов оценивается с помощью индекса активации – отношение антигенстимулированной продукции цитокина к его спонтанной секреции.

Пролиферация лимфоцитов стимулированной цельной крови измеряется с применением метода планшетной магнитной сепарации CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и CD19<sup>+</sup> лимфоцитов с последующим люминесцентным анализом уровня АТФ в стимулированных клетках. Антигенспецифическая активация клеточного иммунитета оценивается по уровню пролиферации CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, наличие функционально активных В-клеток памяти или цитотоксических лимфоцитов памяти – по индексу пролиферации CD19<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, соответственно. В качестве количественного критерия пролиферативной активности лимфоцитов используется отношение сигнала люминесценции АТФ антигенстимулированных лимфоцитов к сигналу люминесценции АТФ от нестимулированных лимфоцитов.

В качестве субстанций, применяемых для *ex vivo* стимуляции клеток, помимо пептидных миметиков эпитопов вакцины ВИЧ/СПИД, можно использовать цельные белки и даже вирионы, поскольку процессинг и презентация антигена происходит в естественных условиях. Применение для антигенной стимуляции смеси псевдовиральных клонов ВИЧ-1 из панелей В или А субтипов, с одной стороны, моделирует иммунные реакции, возникающие в организме вакцинированного добровольца при взаимодействии ВИЧ-1 с клетками крови, включая CD4<sup>+</sup> клетки-мишени, а с другой – обеспечивает стимуляцию клеток иммунологической памяти широким разнообразием антигенов ВИЧ-1, что по простоте, безопасности и информативности получаемых результатов не имеет себе равных среди других методов анализа клеточного иммунитета.

Таким образом, анализ цельной крови, *ex vivo* стимулированной Env-клонами псевдовиральных ВИЧ-1, позволяет одновременно измерять уровень цитокинов, секретируемых антигенстимулированными клетками, и антигенспецифическую пролиферацию лимфоцитов. В методе исключаются ошибки, связанные с выбором син-

тетического антигена и интерпретацией результатов, исключается неспецифическая стимуляция или супрессия в результате изменения микроокружения лимфоцитов. Метод позволяет в планшетном формате быстро (за 1 сут.) и воспроизводимо оценивать напряженность клеточного иммунитета, и может быть рекомендован для исследований активации иммунитета при иммунизации против ВИЧ-1. Количественный параметр напряженности клеточного иммунитета – цитокиновый индекс  $I_{\text{цит}}$  – позволяет исключить митогенную составляющую в иммунном ответе на антиген и учесть реактивность иммунной системы каждого индивидуума. Метод комбинированного иммунологического анализа цельной крови, *ex vivo* стимулированной Env-клонами псевдовирюсов, для одновременного измерения ВИЧ-специфического клеточного иммунного ответа по уровню секретированных цитокинов и пролиферации лимфоцитов рекомендован для внедрения в клиническую практику.

### Заключение

Панели Env-псевдовирюсных клонов ВИЧ-1 представляют собой универсальный набор антигенов ВИЧ-1 для изучения функциональной активности как гуморального, так и клеточного противовирусного иммунитета при испытаниях вакцин ВИЧ/СПИД. Env-псевдовирюсные клоны используются для мониторинга гуморального иммунного ответа при постановке реакции нейтрализации для выявления протективного потенциала индуцированных вакциной антител в сыворотке крови добровольцев. В методе *ex vivo* антигенной стимуляции клеток крови смесью псевдовирюсных клонов ВИЧ-1, с одной стороны, моделируются клеточные иммунные реакции, возникающие в организме вакцинированного добровольца при взаимодействии ВИЧ-1 с клетками крови, а с другой – обеспечивается стимуляция клеток иммунологической памяти широким разнообразием антигенов ВИЧ-1 в естественных условиях процессинга и презентации вирусных белков.

Проведенные анализ и исследования методов измерения гуморального и клеточного иммунного ответа, обеспечивающих стандартизацию измерений и валидацию этих методов для иммунологического мониторинга вакцин ВИЧ/СПИД, позволяют предложить для внедрения в клиническую практику:

Для измерения уровня гуморального иммунного ответа – набор реагентов, состоящий из контрольных инактивированных ВИЧ-положительных сывороток и псевдовирюсов ВИЧ-1, для измерения нейтрализующей активности иммунных сывороток при проведении доклинических и клинических испытаний ВИЧ-вакцин.

Для измерения уровня клеточного иммунного ответа – метод комбинированного иммунологического анализа цельной крови, стимулированной ВИЧ-антигенами, включая Env-клоны псевдовирюсов, и митогенами, для одновременного измерения (1) уровня цитокинов, как маркеров клеточного иммунного ответа, и (2) уровня пролиферативной активности Т- и В-лимфоцитов.

### Литература

1. Binley J.M., Wrin T., Korber B., Zwick M.B., Wang M., Chappey C., Stiegler G., Kunert R., Zolla-Pazner S., Katinger H., Petropoulos C.J., Burton D.R., 2004. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J. Virol.* 78 (23), 13232–13252.
2. Bonini P., Plebani M., Ceriotti F., Rubboli F., 2002. Errors in laboratory medicine. *Clin Chem.* 48(5), 691–8.
3. Choudhry V., Zhang M.Y., Sidorov I.A., Louis J.M., Harris I., Dimitrov A.S., Bouma P., Cham F., Choudhary A., Rybak S.M., Fouts T., Montefiori D. C., Broder C.C., Quinnan Jr. G.V., Dimitrov D.S., 2007. Cross-reactive HIV-1 neutralizing monoclonal antibodies selected by

- screening of an immune human phage library against an envelope glycoprotein (gp140) isolated from a patient (R2) with broadly HIV-1 neutralizing antibodies. *Virology* 363 (1), 79–90.
4. Cohen J., 2007. AIDS research. Did Merck's failed HIV vaccine cause harm? *Science* 318 (5853), 1048–1049.
  5. Fenyo E.M., Heath A., Dispinseri S., Holmes H., Lusso P., et al., 2009 International Network for Comparison of HIV Neutralization Assays: The NeutNet Report. *PLoS ONE*. February 20, 2009, 4(2): e4505. doi:10.1371/journal.pone.0004505.
  6. Gao F., Robertson D. L., Carruthers C. D., Morrison S. G., Jian B., Chen Y., Barre-Sinoussi F., Girard M., Srinivasan A., Abimiku A. G., Shaw G. M., Sharp P. M., and Hahn B. H., 1998. A comprehensive panel of near-fulllength clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72:5680–5698.
  7. Heagy W., Hansen C., Nieman K., Cohen M., Richardson C., Rodriguez J. L. and West M. A. 2000. Impaired ex vivo lipopolysaccharide-stimulated whole blood tumor necrosis factor production may identify «septic» intensive care unit patients. *Shock*, 14, 271–276.
  8. Huber M., Trkola, A., 2007. Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. *J. Intern. Med.* 262 (1), 5–25.
  9. Hyjek E., Lischner H.W., Hyslop T., Bartkowiak J., Kubin M., Trinchieri G., Kozbor D., 1995. Cytokine patterns during progression to AIDS in children with perinatal HIV infection. *J Immunol*, 155(8), 4060–71.
  10. Ida A. J., Shrestha N., Desai S., Pahwa S., Hanekom A. W. and Haslett A. J. P., 2006. A whole blood assay to assess peripheral blood dendritic cell function in response to Toll-like receptor stimulation. *J Immunol Methods*, 310(1–2), 86–99.
  11. Ida A. J., Shrestha N., Desai S., Pahwa S., Hanekom A. W. and Haslett A. J. P., 2006. A whole blood assay to assess peripheral blood dendritic cell function in response to Toll-like receptor stimulation. *J Immunol Methods*, 310(1–2), 86–99.
  12. Keilholz U., Weber J., Finke J. H., Gabrilovich D. I., Kast W. M., Disis M. L., Kirkwood J. M., Scheibenbogen C., Schlom J., Maino V. C., Lyster H. K., Lee P. P., Storkus W., Marincola F., Worobec A. and Atkins M. B., 2002. *J Immunother*, 25, 97–138.
  13. Kirchner et al., 1982 Kirchner H., Kleinicke C. and Digel W., 1982. A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. *J. Immunol. Methods*, 48, 213–219.
  14. Knipe D., Howley P., Griffin D., Lamb R., Martin M., Roizman B., Straus S., 2001. *Fields Virology*: Lippincott Williams&Wilkins. CD-edition.
  15. Langezaal I., Hoffmann S., Hartung T. and Coecke S., 2002. Evaluation and prevalidation of an immunotoxicity test based on human whole-blood cytokine release. *Altern Lab Anim*, 30, 581–595.
  16. Magee M. H., Blum R. A., Lates C. D. and Jusko W.J., 2002. Pharmacokinetic/pharmacodynamic model for prednisolone inhibition of whole blood lymphocyte proliferation. *Br J Clin Pharmacol*, 53, 474–484.
  17. Marechal, V., Clavel, F., Heard, J.M., Schwartz, O., 1998. Cytosolic Gag p24 as an index of productive entry of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72 (3), 2208–2212.
  18. Mascola, J. R., and G. J. Nabel. 2001. Vaccines for the prevention of HIV-1 disease. *Curr. Opin. Immunol.* 13:489–495.
  19. Mascola J. R., D'Souza P., Gilbert P., Hahn B. H., Haigwood N. L., Morris L., Petropoulos C. J., Polonis V. R., Sarzotti M., Montefiori D.C., 2005. Recommendations for the design and use of standard virus panels to assess neutralizing antibody responses elicited by candidate human immunodeficiency virus type 1 vaccines. *J. Virol.* 79 (16), 10103–10107.
  20. McMichael A. J., 2006. HIV vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 227–255.
  21. Mira J. P., Cariou A., Grall F., Delclaux C., Losser M. R., Heshmati F., Cheval C., Monchi M., Teboul J. L., Riché F., Leleu G., Arbibe L., Mignon A., Delpech M., Dhainaut J. F., 1999. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA*, 282(6), 561–8.



22. Montefiori D., Sattentau Q., Flores J., Esparza J., Mascola J., 2007. Antibodybased HIV-1 vaccines: recent developments and future directions. *PLoS Med.* 4 (12), e348.
23. Noga O., Hanf G., Brachmann I., Klucken A. C., Kleine-Tebbe J., Rosseau S., Kunkel G., Suttorp N., Seybold J., 2006. Effect of omalizumab treatment on peripheral eosinophil and T-lymphocyte function in patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 117(6), 1493–9.
24. Paul W., 2003. *Fundamental Immunology*, Lippincott – Raven, Philadelphia.
25. Pinto R. A., Arredondo S. M., Bono M. R., Gaggero A. A., Díaz P. V., 2006. T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol. *Pediatrics*, 117(5), 878–86.
26. Polonis V. R., Brown B. K., Borges A. R., Zolla-Pazner S., Dimitrov D. S., Zhang M-Y., Barnett S. W., Ruprecht R. M., Scarlatti G., Fenyö E-M., Montefiori D. C., McCutchan F. E., Michael N. L., 2008. Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination. *Virology* 375 p.315–320.
27. Prabhakar U. and Kelley M., 2008. Edited by: *Validation of Cell-Based Assays in the GLP Setting: A Practical Guide*. John Wiley & Sons, Ltd., P.291
28. Ray C. A., Dumaual C., Willy M., Fill J., O'Brien P. J., Gourley I., Devanarayan V. and Konrad R. J., 2006. Optimization of analytical and pre-analytical variables associated with an ex vivo cytokine secretion assay. *J Pharm Biomed Anal*, 41(1), 189–195.
29. Repits J., Sterjovski J., Badia-Martinez D., Mild M., Gray L., Churchill M. J., Purcell D. F. J., Karlsson A., Albert J., Fenyö E. M., Achour A., Gorry P. R., Jansson M., 2008. Primary HIV-1 R5 isolates from end-stage disease display enhanced viral fitness in parallel with increased gp120 net charge. *Virology* 379 p.125–134.
30. Rodríguez-Caballero A., García-Montero A. C., Bueno C., Almeida J., Varro R., Chen R., Pandiella A., Orfao A., 2004. A new simple whole blood flow cytometry-based method for simultaneous identification of activated cells and quantitative evaluation of cytokines released during activation. *Lab Invest*, 84(10), 1387–1398.
31. Schindler S., Asmus S., Aulock V. S., Wendel A., Hartung T. and Fennrich S., 2004. Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity testing. *J Immunol Methods*, 294, 89–100.
32. Sottong P. R., Rosebrock J. A., Britz J. A., Kramer T. R., 2000. Measurement of T-Lymphocyte Responses in Whole-Blood Cultures Using Newly Synthesized DNA and ATP. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7 (2), 307–311.
33. Sousa A. O., Lee F. K., Freiji R., Lagrange P. H., Nahmias A., 1998. Human immunodeficiency virus infection alters antigen-induced cytokine responses in patients with active mycobacterial diseases. *J Infect Dis*, 177(6), 1554–62.
34. Srivastava I. K., Ulmer J. B., Barnett S. W., 2005. Role of neutralizing antibodies in protective immunity against HIV. *Hum. Vaccin.* 1 (2), 45–60.
35. Trkola A., Pomales A. B., Yuan H., Korber B., Maddon P. J., Allaway G. P., Katinger H., Barbas C. F., Burton D. R., Ho D. D., et al., 1995. Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J. Virol.* 69:6609–6617.
36. Van der Linden M. W., Huizinga T. W., Stoeken D. J., Sturk A. and Westendorp R. G., 1998. Determination of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10 production in a whole blood stimulation system: assessment of laboratory error and individual variation. *J Immunol Methods*, 218, 63–71.
37. Zolla-Pazner S., 2004. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* 4 (3), 199–210.
38. Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г. Биокинетика: Москва, 1999. С. 404-437.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ВИЧ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА У ДОБРОВОЛЬЦЕВ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ АНТИ-ВИЧ ВАКЦИНОЙ**

Необходимой стадией при оценке специфической активности анти-ВИЧ вакцины является анализ специфического клеточного ответа. В настоящее время принято считать, что протективный потенциал вакцин против хронических заболеваний (в частности, ВИЧ-инфекции) связан с формированием полифункциональных Т-лимфоцитов, которые способны к одновременной экспрессии и секреции набора цитокинов (ИЛ-2, ФНОальфа, ИФНгамма) и литических молекул (гранзимы, перфорины). Методы для количественной оценки цитотоксического иммунного ответа непрерывно совершенствуются. Наряду с методом ELISpot незаменимым является применение метода внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) и методологии МНС-тетрамеров. Использование современных методов позволит ответить на вопрос, в какой мере изучаемые вакцины против ВИЧ-инфекции являются эффективными при активации иммунного ответа.

### **Метод ELISpot**

#### **1. Выделение лимфоцитов**

Для постановки ELISpot-метода, для последующего изучения клеточного иммунного ответа, необходимо провести процедуру выделения мононуклеарных клеток периферической крови человека из цельной крови. До начала и после окончания процедуры помещение, рабочие поверхности, оборудование необходимо облучить ультрафиолетовым светом в течение 1 часа.

Перед входом в помещение, где проводят процедуру, надеть стерильную спецодежду: халат, тапочки, перчатки.

Непосредственно перед началом работы рабочую поверхность и используемое оборудование обработать этиловым спиртом.

В работе использовать только одноразовые стерильные расходные материалы, или стерильную стеклянную посуду.

#### **Техника проведения**

В подготовленные пробирки внести по 5 мл стерильного р-ра Хенкса и по 5 мл крови с ЭДТА из вакутейнеров, перемешать, закрыть стерильной фольгой.

В стерильные полипропиленовые пробирки-фальконы с закручивающимися крышками на 15 мл внести по 4 мл среды для выделения лимфоцитов LSM.

На среду LSM медленно наслаивать разведенную р-ром Хенкса кровь, при этом пробирку с LSM держать под наклоном 45°.

Центрифугировать 40 мин 1400 об/мин 20 °С на настольной центрифуге «Eppendorf».

В стерильные стеклянные центрифужные пробирки (на каждый образец – 1 пробирку) внести по 6 мл среды R10. После центрифугирования из пробирок с образцами крови с LSM удалить верхнюю фракцию. Оставшуюся часть плазмы с лимфоидным кольцом (примерно 2 мл) отобрать в пробирку со средой R10.

Центрифугировать 10 мин 1400 об/мин 20 °С на настольной центрифуге «Eppendorf».

Удалить супернатант, к осажденным клеткам добавить по 1 мл среды R10, клетки хорошо ресуспендировать на вортексе. Затем добавить еще 9 мл среды R10.

Центрифугировать 10 мин 1400 об/мин 20 °С на настольной центрифуге «Eppendorf».

Удалить супернатант, осажденные клетки ресуспендировать в 1 мл R10F. Отобрать в пробирки «Eppendorf» аликвоты из каждого образца и сделать разведение 1:10 полной питательной средой (ППС) (10% FCS, 2 mM L-глутамина, RPMI 1640) .

Подсчет лимфоцитов проводят в камере Горяева по диагонали в 5-ти больших квадратах.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови человека из цельной крови рекомендуется проводить сразу после ее получения. Замораживать кровь

нельзя. Выделенные лимфоциты желательно использовать для постановки методики ELISpot или анализа на проточном цитофлуориметре сразу после выделения.

Возможно замораживание мононуклеарных клеток при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  в растворе 10% диметилсульфоксида с 90% эмбриональной сывороткой плодов коров из расчета 5–15 млн лимфоцитов в 1 мл раствора для замораживания.

## **2. Принцип ELISpot-метода, достоинство и рациональность использования**

Метод ELISpot (Enzyme-linked ImmunoSpot) является твердофазной модификацией метода ELISA, с помощью которого выявляют продукты секреции ИКК (цитокинов, иммуноглобулинов) [1–3]. Уровень детекции позволяет обнаруживать одну секретирующую клетку из 100 000 клеток лимфоцитов. Позволяет не только идентифицировать биосинтез клетками искомого белка, но и определять его концентрацию. Результат учитывается автоматически с помощью созданных для этих целей специальных приборов. ELISpot позволяет визуализировать секретируемый продукт на поверхности активированной или стимулированной к иммунному ответу индивидуальной клетки. Таким образом, ELISpot дает и качественную (тип иммунного белка) и количественную (число отвечающих клеток) информацию.

Технология ELISpot является одним из самых чувствительных методов клеточного анализа. В зависимости от анализируемых цитокинов данный анализ в 20–200 раз чувствительнее стандартного иммуноферментного твердофазного анализа (ИФА). В действительности ELISpot демонстрирует такую же чувствительность, как и анализ RT-PCR (ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией), но вместо мРНК он выявляет секретируемый белок. Данный факт является преимуществом при анализе цитокинов, поскольку многие цитокины регулируются трансляционно. Кроме того, ELISpot менее подвержен негативному действию связывающих белков и активностью протеазы, так как секретируемые белки связываются с иммобилизованным антителом сразу после выделения. Благодаря высокой чувствительности технология ELISpot оказалась особенно полезной при изучении небольших популяций активных клеток, например, в специфических иммунных реакциях.

Пределы его чувствительности ниже 1/100 000, что делает этот метод очень полезным для мониторинга антиген-специфичных ответов в различных областях иммунологических исследований, включая исследования рака, пересадку органов, инфекционные заболевания и разработку вакцин. На сегодняшний момент технология IFN- $\gamma$  ELISpot используется в крупномасштабных исследованиях для апробации новых кандидатов на вакцину против ВИЧ [9–13]. Технология ELISpot используется для определения эффективности вакцины путем измерения способности вызвать сильную Т-клеточную реакцию.

Тестирование большого числа проб при помощи технологии ELISpot не требует предварительной идентификации эпитопов и их рестрикции по антигенам главного комплекса совместимости класса I. Хотя как метод анализа ELISpot существует уже более 20 лет, он все еще претерпевает значительные изменения и усовершенствования. Современный ELISpot анализ проводят с использованием ELISpot-ридеров, которые обладают компьютерными возможностями визуализации активно продуцирующих клеток. Это позволяет максимально автоматизировать анализ и обеспечить более высокую его точность. В FDA и NIH опубликованы стандартные протоколы проведения ELISpot, проведены стандартизация и валидация метода [4–7].

Среди основных производителей тест систем для ELISpot можно назвать BD Bioscience, R&D systems, Mabtech, Oxford Immunotec и др.

## **3. Технология ELISpot-метода**

Реакцию проводят с применением коммерческих тест-систем ELISpot согласно инструкции предприятия-изготовителя, приложенной к набору.

Стандартный протокол:

Цитокин-специфические антитела (Ат) иммобилизуются на 96-луночной планшете ELISpot. Для иммобилизации антител рекомендуют использовать 15 мкг/мл иммобилизованного антитела (100 мкл/лунка) на основании того факта, что качество пятна ухудшается при дальнейшем разбавлении иммобилизованного антитела.

Чаще всего анализируемым агентом, служащим в качестве иммунного коррелята, для реакций CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) выбирается интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ).

CD8<sup>+</sup> Т-клетки стимулируют при помощи пула пептидов в течение 16 часов в 5% атмосфере CO<sub>2</sub> при 37 °С. В качестве отрицательного контроля используют клетки, культивируемые только в среде (без добавления пептидов).

Для окончательного определения пятен используют осаждающий субстрат. Тип субстрата зависит от того, какой фермент используют, обычно используют BCIP/NBT (нитросиний тетразолий) для ALP и TMB (тетрамилит бензидин) для HRP, которые являются сильными активаторами Т-клеток.

Во время инкубации клетки активизируются и продуцируют цитокин, который присоединяется к иммобилизованным антителам.

Клетки отделяют, добавляют вторые антитела, которые могут быть напрямую конъюгированы с ферментом или биотинилированы.

Если для обнаружения используют биотинилированное антитело, добавляют стрептавидинферментный конъюгат.

В заключение субстрат образует окрашенное пятно на месте секретирующей клетки.

Для окончательного определения пятен используют осаждающий субстрат. Тип субстрата зависит от того, какой фермент используют, обычно используют BCIP/NBT (нитросиний тетразолий) для ALP и TMB и АЕС (тетрамилит бензидин и аминоксилотилцеллоза) для HRP, поскольку оба из них демонстрируют отличную чувствительность и обеспечивают отчетливые пятна, которые легко оценить.

#### **4. Подсчет спотов**

Посредством подсчета числа пятен в стимулированных культурах и контролях определяется частота реактивных клеток. Подсчет пятен в лунках планшетов производится с помощью ELISpot ридера.

#### **5. Необходимые оборудование и реагенты**

Ламинар  
Центрифуга («Eppendorf» 5415D)  
CO<sub>2</sub>-инкубатор  
Микроскоп Микмед-2  
Элиспот-ридер  
Дозаторы и наконечники  
Пробирки 12 × 75 мм Falcon  
Пробирки центрифужные конические  
Одноразовые наконечники до 10, 200, 1000 и 5000 мкл  
Пипетки на 0,5–10, 10–100, 100–1000 и 1000–5 000 мкл  
Пипетка 8-канальная 50–300 мкл  
Камера Горяева 2-сеточная  
Перчатки резиновые  
Фосфатно-солевой буферный раствор (PBS)  
Среда RPMI-1640  
Спирт этиловый  
Питательная среда RPMI-1640 стерильная жидкая  
L-глутамин, сухой, стерильный, 150 мг/фл  
Раствор Хенкса стерильный  
Гентамицин, раствор, 50 мг/мл

Уксусная кислота ледяная  
Эмбриональная сыворотка плодов коров, инактивированная при 56 °C  
«Invitrogen», США  
Среда для выделения лимфоцитов LSM  
Первые АТ к цитокину  
Вторые АТ к цитокину, меченные биотином  
Стрептавидинферментный конъюгат  
Субстраты BCIP/NBT или АЕС, или ТМВ  
Специфические пептиды

## Литература

1. Assay. Methods and Protocols; Handbook of ELISpot. Ed. Kalyuzhny LA. Human Press Inc.
2. Janetzki S, Cox JH, Oden N, Ferrari G (2006) Standardization and validation issues of the ELISpot assay. *Methods Mol Biol* 302:51–86.
3. Cox JH, Ferrari G, Janetzki S (2006) Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISpot assay. *Methods* 38:274–282.
4. FDA Guideline for Industry. Text on validation of Analytical Procedures. Available at: [www.fda.gov/cder/guidance/ichq2a.pdf](http://www.fda.gov/cder/guidance/ichq2a.pdf); Internet; accessed August 26, 2004.
5. Standardization and Validation Issues of the ELISpot Assay 8555. FDA Code of Federal Regulations Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies. Available at: [http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_01/21cfr58\\_01.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/21cfr58_01.html); Internet; accessed August 26, 2004.
6. NIAID Division of AIDS (2003) Validating an immunological assay toward licensure of a vaccine. <http://www.niaid.nih.gov/hivvaccines/validation.htm>
7. FDA Guideline for Industry. Text on validation of Analytical Procedures. <http://www.fda.gov/cder/guidance/ichq2a.pdf> Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., et al. (2009) Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 361: 2209–2220.
8. Mwau, M., McMichael, A., and Hanke, T. (2002) Design and validation of an enzyme-linked immunospot assay for use in clinical trials of candidate HIV vaccines. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 18, 611–618.
9. Cox JH, Ferrari G, Kalams SA, Lopaczynski W, Oden N, D'Souza MP, ELISpot Collaborative Study Group (2005) Results of an ELISpot proficiency panel conducted in 11 laboratories participating in international human immunodeficiency virus type 1 vaccine trials. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21:68–81.
10. Dubey S, Clair J, Fu T-M, Guan L, Long R, Mogg R, Anderson K, Collins KB, Gaunt C, Fernandez VR, Zhu L, Kierstead L, Thaler S, Gupta SB, Straus W, Mehrotra D, Tobery TW, Casimiro DR, Shiver JW (2007) Detection of HIV vaccine-induced cell-mediated immunity in HIV-seronegative clinical trial participants using an optimized and validated enzyme-linked immunospot assay. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45:20–27.
11. Mwau M, McMichael AJ, Hanke T (2002) Design and validation of an enzyme-linked immunospot assay for use in clinical trials of candidate HIV vaccines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18:611–618.
12. Samri A, Durier C, Urrutia A, Sanchez I, Gahery-Segard H, Imbart S, Sinet M, Tartour E, Aboulker J-P, Autran B, Venet A, The ANRS ELISpot Standardization Group (2006) Evaluation of the interlaboratory concordance in quantification of HIV-specific T cells with a gamma interferon enzyme-linked immunospot assay. *Clin Vaccine Immunol* 13:684–697.
13. Russell ND, Hudgens MG, Ha R, Havenar-Daughton C, McElrath MJ (2003) Moving to human immunodeficiency virus type 1 vaccine efficacy trials: defining T cell responses as potential correlates of immunity. *J Infect Dis* 187:226–242.

## Исследование ВИЧ-специфической активности цитотоксических лимфоцитов с использованием проточной цитофлуориметрии и метода МНС-тетрамеров

Технология МНС-пептид-тетрамерных комплексов была предложена в 1996 году Altman at al. [1, 2] и до сих пор остается самым эффективным и современным методом анализа антиген-специфичного Т-клеточного иммунного ответа. Метод основан на принципе распознавания Т-лимфоцитом через свой Т-клеточный рецептор антигенного эпитопа в комплексе с молекулой МНС, но только в инвертированном виде: растворимые комплексы молекул МНС с вирусным пептидом, несущие флуоресцентную метку, до-

бавляют к суспензии клеток. МНС-тетрамеры находят в этой смеси те Т-клетки, которые имеют соответствующий Т-клеточный рецептор. Поскольку комплекс МНС-пептид помечен флуоресцеином, данное связывание приводит к флуоресцентному мечению клетки [2].

Как только иммуногенные МНС-пептиды, связавшиеся с Т-клеткой, идентифицированы цитофлуориметром, можно количественно контролировать иммунную реакцию на вакцину. Используя МНС-тетрамеры и моноклональные антитела anti-CD8, представленные на поверхности иммунокомпетентных клеток, можно с помощью проточного цитофлуориметра выделить субпопуляцию антиген-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которые образовались в результате иммунизации вакциной против ВИЧ, провести подсчет этих клеток в процентах относительно общего количества выделенных лимфоцитов и в результате оценить степень выраженности ВИЧ-специфического Т-клеточного иммунитета у добровольцев [12].

К достоинствам метода МНС-тетрамеров можно отнести, во-первых, быстроту получения количественных результатов. Вся процедура окрашивания и регистрации результатов занимает 3–4 часа. Во-вторых, отсутствие необходимости использовать радиоизотопы, а также выращивания и стимулирования клеток *in vitro*. В-третьих, очень высока специфичность и чувствительность данного метода. При использовании МНС-тетрамеров в комбинации с проточной цитофлуориметрией минимальный порог детекции составляет 0,02%, или 1:5000 (одна антиген-специфичная клетка на популяцию из 5000 CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, или 1:50000 для периферических мононуклеаров) [3]. В четвертых, сохранение целостности клетки, что позволяет использовать ее для дальнейшего анализа. Кроме того, важным достоинством этого метода является возможность одновременного детального изучения экспрессии клеточных маркеров анализируемой субпопуляции лимфоцитов, определения их фенотипических и функциональных характеристик [4, 5].

Рациональность использования МНС-пентамеров для измерения иммунного ответа добровольцев в рамках разработки вакцины было освещено и обосновано с научной и практической точки зрения в нескольких академических изданиях, и рекомендовано ВОЗ для включения в перечень методов для оценки специфической активности ВИЧ вакцин, как было заявлено на рабочей встрече ВОЗ «Научные и нормативные аспекты клинических испытаний новых вакцин против ВИЧ и других инфекций» 3–5 марта 2009 г. в Москве в докладе доктора А. Haggari. Технология МНС-тетрамеров начинает активно использоваться при проведении доклинических, клинических испытаниях вакцин против ВИЧ и оценке иммунного статуса при ВИЧ-инфекции [6–11].

## **МЕТОДИЧЕСКИЙ ПРОТОКОЛ**

### **Исследование ВИЧ-специфической активности цитотоксических лимфоцитов с использованием техники МНС-пентамеров и проточной цитофлуориметрии**

Лимфоциты добровольцев, вакцинированных анти-ВИЧ-вакциной, анализируются на эффективность связывания с МНС-пентамерами фирмы ProImmune, UK, в составе которых находится пептиды белков ВИЧ-1. Для более полного и достоверного анализа ВИЧ-специфического иммунного ответа после иммунизации рекомендуется использование комбинации из нескольких МНС-пентамеров.

Ниже, в качестве примера, приведена методика с двумя видами пентамеров, содержащих пептиды (названные в тексте далее как А и В), имитирующими вирусные эпитопы белков Env и Gag.

### **Необходимые оборудование и реагенты**

Pro5 Recombinant human MHC Pentamer, меченные PE (ProImmune, UK):

А – А × 0201 KLTPLCVTL

В – А × 0201 SLYNTVATL

Моноклональные антитела CD8-FITC (ProImmune, UK)

Фосфатно-солевой буферный раствор (PBS)

Фетальная бычья сыворотка, инактивированная нагреванием (FBS)

Центрифуга (Eppendorf 5415D)

Пробирки 12 × 75 мм Falcon для проточного цитометра (BD Biosciences, USA)

Дозаторы и наконечники

Проточный цитофлуориметр BD FACSAria™ (BD Biosciences, USA) (или аналог)

Постановку метода осуществляют согласно руководству фирмы-производителя пентамеров ProImmune, UK. Для постановки метода используют аликвоту лимфоцитов, оставшихся после постановки реакции ELUSpot и выделенных из крови добровольцев, вакцинированных анти-ВИЧ вакциной, с использованием метода центрифугирования в градиенте фиколла согласно стандартному протоколу. Для каждого добровольца маркируют по 2 чистых полистироловых пробирки 12 × 75 мм Falcon – А и В. В обе пробирки вносят по 0,1 млн лимфоцитов в 100 мкл раствора PBS с 2% FBS. Затем добавляют в темноте 5 мкл пентамеров в пробирку А – А × 0201 KLTPLCVTL, в пробирку В – А × 0201 SLYNTVATL, и 1 мкл моноклональных антител CD8-FITC в каждую из пробирок, перемешивают пипетированием и инкубируют 40 мин в темноте при 4 °С. По окончании инкубации клетки отмывают 1 мл раствора PBS с 2% FBS, образцы центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин, супернатант декандируют. В каждую пробирку к осадку вносят по 500 мкл раствора PBS с 2% FBS, лимфоциты тщательно ресуспендируют и анализируют на проточном цитофлуориметре BD FACSAria™.

### **Сбор и анализ данных, полученных методом проточной цитометрии**

Сбор данных проводят в программе BD FACSDiva™ v6. В созданном эксперименте строят точечный график с координатами по параметрам интенсивности флуоресценции CD8-FITC и бокового светорассеивания – CD8-FITC vs SSC (гетерогенный гейтинг). В процессе сбора данных применяют «живой гейт» на CD8-лимфоцитах и собирают не менее 200 000 клеток.

Для анализа данных строят точечный график с координатами по параметрам интенсивности флуоресценции CD8-FITC и бокового светорассеивания – CD8-FITC vs SSC. На полученном графике выделяют гейт CD8-лимфоцитов (R1). Количество вирус-специфических CD8-лимфоцитов оценивают на точечном графике CD8-FITC vs исследуемый пентамер-РЕ. Определяют процент ВИЧ-специфических CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов относительно общей популяции CD8-клеток отдельно для пентамера А и В.

### **Литература**

1. Altman J.D., Moss P., Goulder P. et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 1996, 274: 94–96.
2. Altman J.D. Flow cytometry applications of MHC tetramers. *Methods Cell Biol.* 2004; 75: 433 – 452.
3. Sun Y., Iglesias E., Samri A. et al. A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells. *J. Immunol. Methods* 2003, 272: 23–34.
4. Bousso P. Generation of MHC-peptide tetramers: a new opportunity for dissecting T-cell immune responses. *Microbes and Infection*. 2000, 2: 425–429.
5. Xu X.N., Screaton G.R. MHC/peptide tetramer-based studies of T cell function. *J. Immunol. Methods* 2002, 268:21 – 28.
6. Earl, P.L. et al. (2009). Design and evaluation of multi-gene, multi-clade HIV-1 MVA vaccines. *Vaccine*. 27: 5885–5895.
7. Harari, A. et al. (2008). An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *J Exp Med*. 205: 63–77.
8. Shephard, E. et al. (2008). A multigene HIV type 1 subtype C modified vaccinia ankara (MVA) vaccine efficiently boosts immune responses to a DNA vaccine in mice. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 24: 207217.

9. Vali, B. et al. (2008). HIV-specific T-cells accumulate in the liver in HCV/HIV co-infection. PLoS one. 3: e3454.
10. Vali, B. et al. (2010). Characterization of cross-reactive CD8+ T-cell recognition of HLA-A2-restricted HIV-Gag: SLYNTVATL and HCV-NS5b: ALYDVVSKL epitopes in individuals infected with Human Immunodeficiency and Hepatitis C Viruses. Journal of Virology.
11. Currier JR et al. (2010) Phase I safety and immunogenicity evaluation of MVA-CMDR, a multigenic, recombinant modified vaccinia Ankara-HIV-1 vaccine candidate. PLoS One. 2010 Nov 15;5(11):e13983.
12. Карпенко Л.И., Мечетина Л.В., Регужева А.Ю. МНС-мультимеры и их применение в изучении противовирусного иммунного ответа. ЖМЭИ. 2011. № 2. С.112–119.



## ГЛАВА 8

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАКЦИН ПРОТИВ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

СОСТАВИТЕЛЬ: д. м. н. Л.В. Саяпина, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Центр экспертизы и контроля МИБП

Необходимость создания эффективных и надежных средств иммунопрофилактики особо опасных инфекционных заболеваний обусловлена существующей вероятностью их завоза из стран ближнего и дальнего зарубежья, а также наличием их природных очагов на территории Российской Федерации. Особую актуальность вакцинопрофилактика приобретает в случае использования возбудителей, входящих в I–II группу патогенности, в качестве биологических агентов.

На территории Российской Федерации вакцинация против особо опасных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сальмонеллез) проводится по эпидемическим показаниям. Для профилактики чумы, сибирской язвы, бруцеллеза и туляремии применяются живые вакцины отечественного производства. Специфическая профилактика холеры осуществляется вакциной холерной бивалентной химической, а для профилактики сальмонеллеза используется вакцина сальмонеллы культуральная инактивированная.

В настоящее время достижения современной молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии открывают принципиально новые возможности в области создания эффективных и безопасных вакцин «нового поколения». К таким вакцинам относят рекомбинантные, комбинированные, субъединичные, антиидиотипические и ДНК-вакцины. Следует отметить, что при разработке и исследовании вакцин, в том числе и против особо опасных инфекционных заболеваний, необходимо руководствоваться требованиями ВОЗ, которые касаются прежде всего их безопасности, реактогенности и иммунологической эффективности.

**Чумные вакцины.** Длительное применение вакцины чумной живой на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ показало ее высокую эффективность при накожном, подкожном и ингаляционном способах иммунизации. Одним из недостатков чумной живой вакцины является невозможность ее применения в качестве средств экстренной профилактики в осложненных условиях совместно с антибиотиками. В связи с этим, научно-исследовательские работы направлены на получение субъединичных (химических) вакцин, пригодных для одновременной специфической и экстренной профилактики при возникновении эпидемиологической обстановки, связанной с чрезвычайными ситуациями техногенного или биотеррористического характера.

В настоящее время интенсивно проводятся исследования по созданию химических вакцин, в состав которых входят протективные антигены.

*Y. pestis.* Совершенствование вакцинопрофилактики чумы осуществляется путем создания рекомбинантных аналогов на основе чумного вакцинного штамма. Сконструированы противочумные вакцины на основе плазмидной ДНК, экспрессирующей капсульный антиген (F1), лишенный сигнального пептида (pc/decaF1), или V-антиген, обеспечивающие защиту животных от заражения вирулентным штаммом чумного микроба. Ведутся исследования по созданию оральной чумной вакцины на основе аттенуированных штаммов *Salmonella typhimurium*, экспрессирующих фракцию I и V-антиген чумного микроба. Перспективным

также является направление по разработке безопасных вакцин на основе антиидиотипических антител, лишенных патогенных свойств и несущих «внутренний образ» антигена.

**Холерные вакцины.** Специфическая профилактика против холеры в Российской Федерации проводится вакциной холерной химической бивалентной, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой. За рубежом широко применяется рекомбинантная вакцина холерная инактивированная суспензия для приема внутрь (Дюкорал). Вместе с тем, эти вакцины оказались недостаточно эффективными при заболевании, вызванном эпидемически опасным штаммом *V. cholerae* O139 серогруппы.

Перспективными для конструирования живых вакцин являются исследования по созданию холерных штаммов, полученных генноинженерным путем. При разработке химических холерных вакцин наряду с О-антигеном и холерогеном-анатоксином большое значение уделяется факторам адгезии, в том числе, токсин-корегулируемым пилиям адгезии *V. cholerae*. Проводятся исследования по созданию холерных вакцин с использованием теней клеток холерного вибриона.

**Сибиреязвенные вакцины.** Специфическая профилактика сибирской язвы в России проводится двумя вакцинами: сибиреязвенной живой и комбинированной. Иммунологическая эффективность сибиреязвенных вакцин составляет около 90% и сохраняется в течение года. Научно-исследовательские работы по усовершенствованию вакцинопрофилактики против сибирской язвы проводятся в направлениях создания аттенуированных штаммов и конструирования генноинженерных препаратов менее реактогенных, экологически безопасных и более иммуногенных.

Предпринимаются попытки по созданию химической вакцины на основе поверхностного антигена вегетативных клеток *Bacillus anthracis* СТИ-1 с компонентами сибиреязвенного токсина, протективного антигена, отечного фактора и иммуностимуляторов различного происхождения, а также ДНК-вакцины.

**Туляремиальные вакцины.** Вакцина туляремиальная живая, приготовленная из штамма *Francisella tularensis* 15 (линия НИИЭГ), является одним из наиболее эффективных профилактических препаратов, создает стойкий специфический иммунитет в течение 5 лет. Перспективу создания новой живой туляремиальной вакцины связывают с получением изогенных аттенуированных мутантов, рекомбинантных штаммов *F. tularensis*, а также ДНК-вакцин.

Проводятся исследования по созданию химической вакцины на основе полисахаридно-протеинового комплекса внешних мембран туляремиального микроба. В последние годы в качестве основы предлагается С-комплекс туляремиального микроба, в состав которого входят ЛПС и белки с молекулярной массой 17-20 кДа и 65-70 кДа.

**Бруцеллезные вакцины.** Для профилактики бруцеллеза козье-овечьего типа используется вакцина бруцеллезная живая. Будущее при создании бруцеллезных вакцин нового поколения отводится ДНК- и химическим вакцинам, содержащим протективные антигены.

**Сапные и мелиоидозные вакцины.** Специфическая профилактика сапа у людей проводится вакциной сапной культуральной инактивированной. Исследования по разработке вакцин для профилактики мелиоидоза находятся на начальных стадиях разработки.

Прогрессивное развитие биотехнологии в последние годы, а также модернизация уже существующих вакцин привели к созданию новых препаратов, открывающих широкие возможности для совершенствования профилактики ООИ. При этом наиболее важным аспектом при изучении вакцин-кандидатов является проблема их иммунологической безопасности, а также исключения вероятности развития поствакцинальных реакций и осложнений на их введение. Развитие специфического иммунного ответа при вакцинации сопровождается неспецифическими изменениями иммунной системы, которые мо-

гут привести к снижению общей резистентности организма и повлечь за собой развитие иммунодефицитных и аллергических состояний.

Общая схема клинических испытаний новых вакцин предусматривает изучение их иммунологической безопасности. В связи с этим до начала проведения клинических испытаний исследователями оценивается соотношение предвидимого риска и ожидаемой пользы для испытуемого и общества. Испытание нового препарата проводят в случае преобладания ожидаемой пользы к возможному риску применения препарата.

На вакцины-кандидаты против особо опасных инфекций распространяются требования, которые предъявляются к проведению клинических испытаний других лекарственных и иммунобиологических лекарственных препаратов. Необходимо отметить, что разрешение на ограниченные клинические испытания штаммов-кандидатов живых вакцин для профилактики ООИ дается только после их лабораторной оценки специальной комиссией, утвержденной Минздравсоцразвития России. При этом вакцина, представленная для клинических исследований, должна быть приготовлена в условиях надлежащей производственной практики.

Обоснованием для проведения клинического испытания должны служить данные доклинического изучения специфической активности и токсичности исследуемого препарата. Клинические исследования иммунологической безопасности вакцин проводят на базах, аккредитованных клинических учреждений Минздравсоцразвития России, где предусмотрена возможность разворачивания инфекционного или провизорного госпиталей.

Перед проведением клинических испытаний оформляется брошюра исследователя, в которой представлены доклинические данные по исследуемому препарату, имеющие значение для его изучения с участием человека, а также информация о дозировке препарата, кратности и способе его введения, процедуры мониторинга безопасности.

Изучение реактогенности, безопасности и иммунологической эффективности вакцин против особо опасных инфекций проводят на добровольцах в несколько этапов в соответствии с Протоколом клинического исследования, согласованным в установленном порядке.

Учитывая специфику назначения вакцин против особо опасных инфекций и их ограниченное применение (по эпидемическим показаниям) большое внимание уделяется подбору контингента. К вакцинации привлекаются лица в возрасте от 18 до 60 лет, которые ранее не прививались вакцинами против ООИ, не имеющие противопоказаний, предусмотренных инструкцией по применению, в случае их письменного согласия и допуска медицинской комиссией. От каждого добровольца до начала его участия в клиническом исследовании получают в письменной форме «Информированное согласие», подготовленное в соответствии с Хельсинской декларацией и указаниями Совета международной медицинской организации, в котором содержится информация о целях, методах, предвидимых выгодах и возможном риске и уведомляется о своем праве отказаться от участия в исследовании и в любой момент взять назад свое согласие на участие в эксперименте.

При проведении I фазы клинического исследования проводятся широкие клинко-лабораторные исследования, направленные на изучение безопасности вакцин на ограниченной группе людей, во второй фазе – медицинские испытания по оценке безопасности и показателей эффективности на расширенной группе людей.

На каждую фазу разрабатывается отдельный протокол клинических исследований, в котором кратко излагается информация об актуальности разработки препарата, ожидаемых преимуществах его перед другими существующими препаратами аналогичного назначения, наличии препаратов-аналогов за рубежом и их оценка, возрастной заболеваемости соответствующей инфекцией с выделением особо подверженных заболеванию возрастных групп и контингентов населения (группы риска).

Цель и задачи исследования должны включать оценку безвредности, реактогенности и иммунологической эффективности исследуемого препарата, для получения данных,

достаточных для принятия решения о возможности его регистрации ил последующего изучения.

Группы вакцинированных комплектуются методом случайной выборки, должны быть равноценными по возрасту, полу, трудовой деятельности и т.д. Равные по численности контингенты прививаются испытуемой вакциной, препаратом сравнения, или плацебо. Наблюдения за привитыми проводят перед вакцинацией, в сроки развития иммунологических реакций в зависимости от специфической активности вакцины, окончание срока наблюдений – после формирования полноценного иммунитета.

Безвредность и реактогенность вакцин оценивается по клиническим наблюдениям за развитием общих и местных реакций у привитых, сроках их максимальной выраженности, а также по результатам биохимических и серологических исследований.

Клинические испытания по изучению безопасности включают, как правило, клинический анализ крови с развернутой гемоцитогаммой, общий анализ мочи, биохимическое исследование сыворотки крови, снятие ЭКГ. Для вакцин, у которых предусмотрен ингаляционный путь введения, необходимо проводить изучение функции внешнего дыхания методом спирографии определением объема форсирующего выдоха.

В течение всего поствакцинального периода, установленного для каждой вакцины, собираются и обобщаются данные обо всех случаях инфекционных, соматических и аллергических заболеваний, которые фиксируются в индивидуальных картах наблюдения за привитыми, а также случаи нежелательных явлений.

Отдаленные последствия вакцинации оцениваются путем сравнения состояния здоровья добровольцев основных и контрольных групп, по данным первичной обращаемости или заболеваемости на протяжении 6 мес. после испытаний.

Иммунологическую эффективность вакцин исследуют методом сравнения показателей, отражающих состояние гуморального и клеточного звена иммунной системы у людей, вакцинированным исследуемым препаратом, препаратом сравнения или плацебо. Для определения специфических антител к возбудителю особо опасных инфекций в сыворотке крови добровольцев применяют одну из серологических реакций (РНГА, ИФА, РАО), а также определение титров антитоксических, вибриоцидных антител и копроантител при вакцинации против холеры по стандартной методике. Функциональную активность Т-лимфоцитов изучают в реакции бласттрансформации (РБТЛ) с митогенами или специфическими антигенами. Пролиферативную активность лимфоцитов оценивают цитофлуориметрическим методом, основанным на вторичной флуоресценции, которая возникает в результате окрашивания ДНК лимфоцитов специфическими красителями, и измерением ее содержания в лимфоцитах в различных фазах клеточного деления. Определение процентного соотношения пролиферирующих и непролиферирующих лимфоцитов проводят путем расчета гистограмм.

Развитие иммунитета к возбудителям особо опасных инфекций при вакцинации живыми вакцинами определяется клеточно-гуморальными факторами защиты. При этом иммунитет против особо опасных инфекций имеет в основе не только усиление фагоцитарной деятельности клеток ретикуло-эндотелиальной системы, но также изменение реактивности всего организма, всех клеток тканей и нервной системы. Необходимо отметить, что в процессе иммунологической перестройки организма происходит и аллергическая перестройка. Об этом судят по аллергическим внутрикожным пробам в ответ на введении аллергенов к тому или другому возбудителю. У людей, привитых живыми вакцинами, особенно, при ревакцинации, внутрикожная проба в большинстве случаев бывает положительной, у непривитых – отрицательная. Поэтому внутрикожная проба отражает уровень иммунитета и является одним из стандартных методов его оценки до и после вакцинации живыми вакцинами. Необходимо отметить, что до настоящего времени иммунологическую перестройку организма в ответ на введение живых вакцин оценивают косвенными методами. До сих пор нет единого мнения о том, каким методом оценивать характер послепрививочной реакции в развитии иммунитета, так как отсут-

существует высокоэффективные тесты, позволяющие наиболее объективно проводить эпидемиологические наблюдения за привитыми вакциной добровольцами. Несмотря на то, что образование антител у людей, привитых живыми вакцинами, и является показателем иммунологической перестройки организма, в сыворотках крови не всегда удастся выявить антитела, так как они очень медленно накапливаются и содержатся в низких титрах. Кроме того, специфические антитела не являются абсолютными показателями при формировании иммунитета, а в этом процессе принимают участие и другие, такие как гемагглютинины и комплементсвязывающие антитела. Вместе с тем, определение специфических антител в сыворотках крови привитых людей является одним из показателей оценки поствакцинального иммунитета к возбудителям особо опасных инфекций.

Изучение избирательного воздействия на нервную систему осуществляют с использованием электроэнцефалографии, реовазографии сосудов головного мозга, изучения состояния глазного дна, остроты зрения.

При изучении иммуногенности необходимо учитывать, что напряженный иммунитет при введении живых вакцин достигает максимума в течение 1 мес. и снижается к 6 мес. К этому сроку происходит закономерное снижение уровня среднегеометрических титров антител во всех исследуемых группах, в том числе и при вакцинации живыми вакцинами. Живая туляремиальная вакцина формирует в организме привитых иммунитет, который сохраняется на протяжении 5 лет.

Необходимо также учитывать, что между уровнем антител и степенью защищенности от инфекционного агента не всегда существует прямая связь. В то же время, достоверное изменение показателей гуморального и клеточного иммунитета у добровольцев, подтвержденное ранее на моделях животных в прямом опыте, косвенно свидетельствует об определенной иммунологической перестройке организма. При этом иммунизация людей как живыми, так и убитыми или химическими вакцинами против чумы, холеры, бруцеллеза не вызывает, как правило, более, чем четырехкратного повышения титров антител. При этом специфическая сероконверсия отмечается не у всех лиц, а только у 30-70% привитых. По-видимому, уровень развития иммунитета к особо опасным инфекциям определяется особенностями механизма формирования иммунного ответа. Поэтому для создания активного иммунитета у людей против ООИ, кроме туляремиальной вакцины, предусмотрена ежегодная ревакцинация.

В связи с этим при проведении клинических испытаний вакцин против ООИ необходимо планировать изучение иммуногенности вакцин при ревакцинации.

Профилактическую эффективность вакцин против особо опасных инфекций оценивают через 1 год после вакцинации путем сбора и анализа данных о заболеваемости среди привитых испытуемым препаратом, препаратом сравнения или плацебо. Необходимо отметить, что профилактическую эффективность вакцин против ООИ оценить сложно, так как особо опасные инфекции в Российской Федерации, в основном, носят завозной или спорадический характер.

Сопоставление характера и продолжительности прививочных реакций, показателей иммунологической эффективности испытуемой вакцины и препарата сравнения осуществляется после дешифровки всех материалов исследования. Статистическая обработка материала проводится методом вариационной статистики. Анализ полученных результатов позволит сформулировать заключение и решить вопрос о возможности рекомендовать испытуемый препарат в Российской Федерации к регистрации в установленном порядке.

## ГЛАВА 9

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАКЦИН ПРОТИВ КОРИ, ПАРОТИТА И КРАСНУХИ

*СОСТАВИТЕЛИ: к. м. н. Л.А. Гайдерова, к. б. н. Т.Н. Юнасова, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, Центр экспертизы и контроля МИБП*

Корь, эпидемический паротит и краснуха – острые вирусные заболевания, относящиеся к детским воздушно-капельным инфекциям, составляющие не менее 20% инфекционной патологии у детей. Единственным эффективным методом профилактики этих инфекций является вакцинация, осуществляемая в рамках Национального календаря профилактических прививок.

Однако вакцины для профилактики кори, эпидемического паротита и краснухи, как и другие иммунобиологические препараты, могут вызывать поствакцинальные реакции, а в редких случаях и поствакцинальные осложнения (ПВО). Трудности, возникающие при оценке реактогенности вакцин против кори, эпидемического паротита и краснухи в клинических исследованиях, связаны с тем, что патогномичных симптомов, которые позволили бы однозначно считать каждый конкретный случай нормальной вакцинальной реакцией, необычной реакцией или поствакцинальным осложнением, не существует. Дифференциальная диагностика поствакцинальной реакции и интеркуррентного заболевания возможна только в условиях тщательного наблюдения за привитыми с соблюдения основных методических подходов, изложенных в данном документе.

Вакцинальный процесс у привитых против кори, эпидемического паротита и краснухи обычно протекает бессимптомно, лишь у некоторых привитых возможны проявления нормальной вакцинальной реакции, под которой понимают изменения состояния здоровья, связанные с развитием вакцинального инфекционного процесса. Их клинические проявления и частота развития описаны в инструкции по применению соответствующего препарата.

При планировании и проведении исследований по оценке реактогенности вакцин необходимо выполнять следующие требования:

В группу наблюдения предпочтительно включать здоровых детей второго года жизни, подлежащих первичной вакцинации, привитых одной серией вакцины. Численность групп должна быть не менее 150 человек.

Исследования не рекомендуется проводить в период подъема заболеваемости острыми респираторными инфекциями, а для вакцин, содержащих паротитный компонент, и энтеровирусными инфекциями.

Регистрация неблагоприятных событий проводится родителями ребенка.

В поствакцинальном периоде после введения живых вакцин против кори, паротита и краснухи может развиваться гиперемия, отечность и болезненность в месте введения; лихорадка, катаральные явления (кашель, насморк, боль в горле), а также возможно появление сыпи, увеличение лимфатических узлов и околоушных слюнных желез, неврологические симптомы, артриты и артралгии. На каждого вакцинированного заводится «Дневник наблюдения», в котором регистрируют все симптомы, наблюдаемые в поствакцинальном периоде (боли в животе, рвота, судороги, головная боль и прочее). Информацию обо всех возможных симптомах получают у родителей привитого.

Помимо указанных выше симптомов родители должны регистрировать любые неблагоприятные события на протяжении 42 дней после вакцинации моно- или ассоциированным препаратом.

Дифференциальная диагностика неблагоприятных событий вакцинации основана на комплексном анализе клинических, лабораторных и эпидемиологических данных с учетом патогенетических механизмов развития вакцинальных реакций.

Важным критерием диагностики поствакцинальных реакций являются сроки выявления симптоматики, характерные для каждой вакцины.

При оценке полученных данных о реактогенности вакцин против кори, эпидемического паротита и краснухи исследователь должен высказать мнение о наличии причинной связи с вакцинацией с учетом следующих клинических критериев:

- аллергические реакции немедленного типа развиваются не позже, чем через 24 часа после иммунизации, а анафилактический шок – не позже, чем через 4 часа;
- тяжелые аллергические реакции, такие как генерализованная сыпь, отек Квинке и др., развиваются не позднее 3 дня после вакцинации;
- реакция в месте инъекции в виде гиперемии и/или отека может развиться в первые 48 часов после прививки;
- повышение температуры тела и катаральные явления, как правило, развиваются в сроки с 3 по 18 сутки после вакцинации;
- появление сыпи с 6 по 18 день, увеличение лимфатических узлов, неврологические симптомы, артриты и артралгии могут выявляться до 30 дня после вакцинации; увеличение околоушных желез – до 42 дня после вакцинации;
- кишечные, почечные симптомы, сердечная и дыхательная недостаточность не характерны для поствакцинальной реакции и осложнений после вакцинации живыми вирусными вакцинами;
- поствакцинальные реакции обычно сохраняются в течение 2-4 дней и требуют при необходимости лишь симптоматической терапии.

### **Оценка реактогенности живой коревой вакцины**

Живая коревая вакцина относится к слабо реактогенным препаратам.

Проявления реактогенности при введении живой коревой вакцины (ЖКВ) в основном относятся к нормальной вакцинальной реакции и характеризуются повышением температуры тела, катаральными явлениями (легкая гиперемия зева, ринит, кашель, конъюнктивит) и кореподобной сыпью. Указанные симптомы могут наблюдаться с 6 по 18 сутки после прививки.

В исключительно редких случаях возможно развитие ПВО: фебрильных судорог, энцефалита, тромбоцитопенической пурпуры.

*Фебрильные судороги* – судорожный синдром на фоне гипертермии – крайне редкое осложнение может развиваться с 5 по 18 день после прививки. Дифференциальный диагноз данного осложнения проводят с фебрильными судорогами, обусловленными лихорадкой при интеркуррентном инфекционном заболевании; дебютом эпилепсии; органическими заболеваниями нервной системы с судорожным синдромом (синдром Веста, инфантильные спазмы и пр.), соматическими заболеваниями, которые сопровождаются судорогами (спазмофилия, диабет).

Подтверждение диагноза ПВО основывается на отсутствии симптомов интеркуррентного заболевания; появлении судорог в сроки с 5 по 18 день после вакцинации; на данных анамнеза об отсутствии или наличии судорог у пациента при повышенной температуре тела; кратковременности приступов, отсутствии остаточных явлений и лабораторных исследованиях для исключения другой этиологии судорог (гипокальциемия, гипогликемия и пр.).

*Вакциноассоциированный коревой энцефалит* – острый энцефалит может развиваться в сроки с 5 по 15 день, реже до 1 месяца после прививки, характеризуется тяжелым течением

нием, общемозговой и очаговой симптоматикой, изменениями в спинномозговой жидкости; частота развития 1:1 000 000 привитых.

Дифференциальный диагноз поствакцинального энцефалита проводят с клещевым энцефалитом, энцефалитами, вызванными коревой или краснушной инфекциями. Подтверждению диагноза ПВО помогает типичная клиническая картина энцефалита, развившаяся после проведенной прививки против кори; выявление при серологическом обследовании больного нарастания титра IgM к вирусу кори на 14-21 сутки после вакцинации; выделение от больного вакцинного штамма, данные эпидемиологического расследования, свидетельствующие об отсутствии контакта с больными инфекционными заболеваниями и о благоприятной эпидемиологической обстановке в отношении инфекций, осложняющихся энцефалитом.

*Тромбоцитопеническая пурпура* – крайне редкое ПВО, проявляющееся резким снижением количества тромбоцитов и острым геморрагическим синдромом, может развиваться с 5 по 21 дни после вакцинации коревой вакциной. Клинические проявления, характер течения, лечение и прогноз не отличаются от таковых при тромбоцитопенической пурпуре любой другой этиологии. Дифференциальный диагноз проводят с тромбоцитопениями другой этиологии (острые вирусные инфекции, лекарственные препараты), которые регистрируются значительно чаще, чем после вакцинации; тромбоцитопатиями, впервые проявившимися в поствакцинальном периоде; геморрагическими синдромами, не связанными с поражением тромбоцитов (васкулит, гемофилия и др.). Подтверждению диагноза ПВО помогают отсутствие острых заболеваний за 2–3 недели до прививки и в поствакцинальном периоде, которые могли вызвать появление тромбоцитопенической пурпуры.

#### **Оценка реактогенности живой паротитной вакцины**

При вакцинации живой паротитной вакциной (ЖПВ) у большинства детей вакцинальный процесс протекает бессимптомно. Общие вакцинальные реакции: повышение температуры, катаральные явления со стороны носоглотки (легкая гиперемия зева, ринит) могут наблюдаться с 5 по 15 день после введения вакцины. Редко в сроки от 5 до 42 дней может возникать увеличение околоушных слюнных желез. Возможно развитие фебрильных судорог, рвоты, болей в животе. Описаны редкие (1:200 000) случаи орхита с благоприятным исходом.

Исключительно редко в период с 7 по 30 дни после введения паротитной вакцины возможно развитие серозного менингита, который характеризуется общемозговой симптоматикой (лихорадка, головная боль, рвота), менингеальными симптомами, лимфоцитарным плеоцитозом в спинномозговой жидкости. Дифференциальный диагноз поствакцинального асептического серозного менингита проводят с серозными менингитами другой этиологии, в том числе с менингитом при острой паротитной инфекции и менингитами энтеровирусной этиологии. Подтверждению диагноза ПВО, кроме типичной клинической картины менингита, помогают изменения в ликворе, характерные для асептического серозного менингита; сведения о проведенной прививке в соответствующие сроки; выделение от больного вакцинного штамма вируса паротита; данные серологических исследований о нарастании титра IgG к вирусу паротита на 42-49 сутки после вакцинации. Частота серозных менингитов после применения отечественной моновакцины против эпидемического паротита составляет 0,63: 1 000 000 привитых.

#### **Оценка реактогенности ассоциированной паротитно-коревой вакцины**

Вакцинальный процесс у большинства детей, привитых ассоциированной паротитно-коревой вакциной (АПКВ), протекает бессимптомно.

У незначительной части привитых с 6 по 18 сутки после введения вакцины могут наблюдаться такие симптомы вакцинальной реакции, как повышение температуры, катаральные явления (легкая гиперемия зева, ринит, кашель, конъюнктивит) и кореподобная



сыпь. Редко в сроки от 5 до 42 дней возникает увеличение околоушных слюнных желез, боли в животе, рвота.

Исключительно редко у вакцинированных могут развиваться ПВО: фебрильные судороги, энцефалит, тромбоцитопеническая пурпура, орхит, асептический серозный менингит. Принципы комплексного анализа вышеперечисленной патологии такие же, как описано в разделах по оценке реактогенности коревой и паротитной моновакцин.

### **Оценка реактогенности вакцины против краснухи**

Реакции на введение краснушной вакцины у детей нетяжелые и встречаются редко. Среди них могут отмечаться субфебрилитет, реже увеличение заднешейных и затылочных лимфатических узлов, кратковременная сыпь. Выраженность поствакцинальных реакций усиливается с возрастом. У взрослых привитых могут развиваться кратковременные артралгии (чаще коленных и локтевых суставов), которые появляются через 2-4 недели после вакцинации. Есть сведения, что после вакцинации, проведенной в послеродовом периоде, а также через 7 дней от начала менструального цикла, осложнения наблюдаются реже.

Крайне редко после введения вакцины против краснухи могут развиваться ПВО такие, как тромбоцитопеническая пурпура. Основные проявления и принципы дифференциальной диагностики этого осложнения описаны выше в соответствующих разделах данной главы.

### **Оценка реактогенности ассоциированных вакцин против кори, эпидемического паротита и краснухи**

Анализ реактогенности ассоциированных вакцин против кори, эпидемического паротита и краснухи проводится с учетом вышеизложенных данных.

Нормальные вакцинальные реакции развиваются с 6 по 18 день после введения вакцины, среди них могут наблюдаться повышение температуры тела, катаральные явления (легкая гиперемия зева, ринит, кашель, незначительный конъюнктивит), реже отмечаются увеличение заднешейных и затылочных лимфатических узлов, кратковременная сыпь. Редко в сроки от 5 до 42 дней возникают рвота, боли в животе, увеличение околоушных слюнных желез, орхит, артралгия.

Исключительно редко у вакцинированных могут развиваться такие ПВО, как фебрильные судороги, энцефалит, тромбоцитопеническая пурпура, серозный менингит.

Заболевания, возникшие в поствакцинальном периоде, подлежат регистрации и эпидемиологическому расследованию. Утвержден перечень таких заболеваний, подлежащих регистрации и расследованию, который приводится ниже.

*Перечень подлежащих регистрации и расследованию заболеваний, наблюдаемых, у привитых против кори, эпидемического паротита и краснухи в поствакцинальном периоде*

Клинические проявления	Вакцина	Возможные сроки появления
Анафилактический шок, анафилактоидная реакция, коллапс	ЖКВ, ЖПВ, АПКВ, вакцина против краснухи, ассоциированные вакцины против КПК	Первые 12 часов
Тяжелые генерализованные аллергические реакции	Те же	До 3 суток
Энцефалит	ЖКВ, АПКВ, вакцина против краснухи, ассоциированные вакцины против КПК	5-30 сутки

Серозный менингит	ЖПВ, АПКВ, асоциированные вакцины против КПК	7-30 сутки
Фебрильные судороги	ЖКВ, ЖПВ, АПКВ, вакцина против краснухи, ассоциированные вакцины против КПК	До 15 суток
Тромбоцитопеническая пурпура	ЖКВ, АПКВ, вакцина против краснухи, ассоциированные вакцины против КПК	5-30 сутки

Порядок регистрации и расследования поствакцинальных осложнений представлен в Методических указаниях МУ 3.3.1.1123-02 «Мониторинг поствакцинальных осложнений и их профилактика», утвержденных Главным государственным санитарным врачом РФ 26.05.02 и в Методических указаниях МУ 3.3.1879-04 «Расследование поствакцинальных осложнений», утвержденных Главным государственным санитарным врачом РФ 04.03.04.

### **Особенности проведения клинических исследований по изучению эффективности (антигенной активности) живых вирусных вакцин для профилактики кори, паротита и краснухи**

При проведении клинических исследований новых вакцин против кори, паротита и краснухи очень важна сертификация штамма, предназначенного для производства вакцины в соответствии с рекомендациями ВОЗ (Серия технических докладов ВОЗ 840, 43 доклад, Женева, 1994 г.). Штаммы должны быть идентифицированы с помощью документов, отражающих его историю с включением сведений о происхождении штамма, методе его аттенуации и уровне пассажа, на котором аттенуация была подвержена клиническим исследованиям. На современном этапе возможна и желательна также идентификация штамма молекулярно-генетическими методами.

С помощью соответствующих лабораторных тестов и клинической апробации при введении восприимчивым людям следует доказать, что кандидатный штамм, предполагающийся для использования в производстве вакцины, безопасен и иммуногенен. При этом изучение реактогенности, безопасности и иммуногенности штаммов рекомендуется начинать с восприимчивых к соответствующей инфекции взрослых добровольцев в возрасте 18-25 лет. Целесообразно последовательное изучение реактогенности и безопасности штаммов (или вакцины) на расширенном контингенте добровольцев каждой возрастной группы в соответствии с Национальным календарем профилактических прививок.

Оценка антигенной активности вакцин против кори, паротита и краснухи определяется по частоте сероконверсий в % у серонегативных привитых. Для установления частоты сероконверсий необходимо исследовать парные сыворотки крови, полученные до вакцинации и у привитых против паротита через 42 дня после вакцинации, у привитых против кори и краснухи – через 30 дней после вакцинации. Исследование сывороток должно проводиться методом иммуноферментного анализа с помощью зарегистрированных и отконтролированных ИФТС.

При оценке антигенной активности указанных препаратов выявление любого уровня специфических антител у серонегативных привитых считается сероконверсией.

При мониторинге популяционного иммунитета к вирусу кори и краснухи оценивается протективный уровень антител. Защитным уровнем коревых антител принято считать 0,2 МЕ/мл. Лиц, у которых выявлены антитела против вируса краснухи в концентрации менее 25 МЕ/мл, относят к группе риска и их рекомендуется привить против краснухи. Лица с уровнем антител более 25 МЕ/мл считаются защищенными. Это особенно важно для женщин детородного возраста.

## Литература

1. Федеральный закон «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней» от 17 июля 1998 г. № 157-ФЗ.
2. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ.
5. Приказ МЗРФ от 29.07.98 №230 «О повышении готовности органов и учреждений Госсанэпидслужбы России к работе в чрезвычайных ситуациях».
6. Методические указания МУ 3.3.1.1123-02 «Мониторинг поствакцинальных осложнений и их профилактика», утвержденные Главным государственным санитарным врачом РФ 26.05.02.
7. Методические указания МУ 3.3.1879-04 «Расследование поствакцинальных осложнений», утвержденные Главным государственным санитарным врачом РФ 04.03.04.
8. Иммунопрофилактика-2005 (справочник)/под ред. В.К. Таточенко, Н.А. Озерецковского. М., 2005. С.174.

## ГЛАВА 10

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАКЦИН ПРОТИВ БЕШЕНСТВА

*СОСТАВИТЕЛИ: д. м. н., проф. А.А. Мовсисянц, А.Ю. Бутырский, А.В. Мухачева, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравоохранения России, Центр экспертизы и контроля МИБП*

Бешенство – острый вирусный энцефалит, вызываемый возбудителем из рода *Lyssavirus* семейства *Rabdoviridae*, характеризующийся абсолютной 100% летальностью в случае развития клинической картины заболевания.

Эпизоото-эпидемиологическая ситуация по бешенству в Российской Федерации, в целом, остается неблагоприятной: ежегодно регистрируется увеличение числа лабораторно подтвержденных случаев бешенства у животных, возрастает количество неблагоприятных по бешенству населенных пунктов, отмечаются случаи бешенства у нетрадиционных видов животных. Как следствие, обращаемость населения за антирабической помощью остается высокой, составляя свыше 400 000 случаев обращений в год, ежегодно регистрируются случаи бешенства у людей.

На современном этапе вакцинопрофилактика остается единственным эффективным средством предотвращения бешенства у людей. Разработка новых, более эффективных, безопасных и экономически выгодных вакцин для профилактики бешенства, отвечающих современным требованиям к «идеальной» вакцине, является важным условием успеха в борьбе с этой грозной инфекцией.

В настоящее время в мире широко применяются культуральные инактивированные вакцины для профилактики бешенства, которые, в зависимости от технологии производства, можно разделить на следующие группы:

1. Концентрированные культуральные инактивированные вакцины:
  - приготовленные на первичной культуре клеток млекопитающих;
  - приготовленные на перевиваемой культуре клеток Vero;
  - приготовленные на культуре куриных/утиных фибробластов;
  - приготовленные на культуре диплоидных клеток человека.
2. Неконцентрированные культуральные инактивированные вакцины.

Цели и задачи клинического исследования лекарственных препаратов для профилактики бешенства определяются в зависимости от фазы испытания.

#### **Ориентировочные критерии включения:**

- согласие на проведение вакцинации после письменного информирования;
- отсутствие в анамнезе указаний на проведение профилактической или лечебно-профилактической вакцинации против бешенства;
- здоровые добровольцы (мужчины и женщины) в возрасте от 19 до 30 лет;
- отсутствие на протяжении последних 3 месяцев инфекционных заболеваний и эпизодов обострения хронических соматических заболеваний;
- отсутствие на протяжении последних 6 месяцев противовирусной терапии, приема стероидных гормональных препаратов (кроме местного применения стероидов в виде мазей, капель в глаза, спреев или ингаляций), иммунодепрессантов, иммуномодуляторов;

- лица, не инфицированные ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусными гепатитами В и С;
- клинико-лабораторные показатели в пределах физиологической нормы.

#### **Ориентировочные критерии исключения:**

- непереносимость компонентов вакцины;
- военнослужащие;
- лица, находящиеся под стражей в следственных изоляторах и отбывающие наказания в местах лишения свободы;
- наличие иммунопатологии;
- наличие в анамнезе тяжелых соматических заболеваний (хронические заболевания сердечно-сосудистой системы, нейроэндокринной системы, печени, почек) или декомпенсация хронического заболевания;
- наличие в анамнезе аллергических реакций (рецидивирующий отек Квинке, генерализованная экзема, сывороточная болезнь);
- беременность или кормление грудью;
- лица с алкогольной, лекарственной или наркотической зависимостью;
- наличие психических заболеваний;
- предшествующее лечение препаратами иммуноглобулина человека, если с момента окончания лечения прошло менее 6 месяцев;
- вакцинация против другого инфекционного заболевания в течение 30 дней до начала испытаний.

Клинические исследования вакцин для профилактики бешенства должны предусматривать проведение всех фаз КИ.

#### **I фаза**

Основные задачи I фазы клинических исследований вакцин для профилактики бешенства заключаются в изучении безопасности и переносимости изучаемой вакцины.

К клиническим исследованиям допускаются вакцины, безопасность и качество которых изучено в доклинических исследованиях, специфическая активность которых соответствует национальным требованиям и требованиям ВОЗ: не менее 2,5 МЕ в дозе для концентрированных и не менее 0,5 МЕ в дозе для неконцентрированных антирабических вакцин.

Дизайн I фазы – открытое не плацебо-контролируемое клиническое исследование.

При планировании клинических исследований необходимо учитывать, что существуют 2 различных подхода к вакцинопрофилактике бешенства:

1. Профилактическая вакцинопрофилактика, которая проводится в плановом порядке лицам из профессиональных групп риска, имеющим высокий риск контакта/инфицирования вирусом бешенства: ветеринары, студенты ветеринарных вузов, лесники, егеря, таксидермисты, работники коммунальных служб, задействованные в отлове безнадзорных животных, сотрудники лабораторий, работающие с «уличным» вирусом бешенства.

Профилактическую иммунизацию проводят по схеме:

- первичная иммунизация – три инъекции по 1 дозе внутримышечно в дельтовидную мышцу по схеме 0, 7, 30 день;
- первая ревакцинация проводится через один год, однократно 1 дозой вакцины;
- последующие ревакцинации проводятся через 3-5 лет (в зависимости от применяющейся вакцины) однократно 1 дозой вакцины.

2. Лечебно-профилактическая вакцинация назначается в экстренном порядке лицам, получившим повреждения от животных с установленным диагнозом бешенства или подозрением на бешенство.

Схема лечебно-профилактической иммунизации против бешенства: 1 доза вакцины внутримышечно в дельтовидную мышцу в 0, 3, 7, 14, 30, 90 день от получения повреждения.

При проведении I фазы клинических исследований вакцин для профилактики бешенства необходимо формировать 2 группы добровольцев, каждая из которых получает либо профилактическую, либо лечебно-профилактическую иммунизацию.

Для участия в клинических исследованиях отбираются здоровые добровольцы независимо от пола в возрасте 19-30 лет.

Оценка безопасности вакцин для профилактики бешенства осуществляется по следующим критериям:

- реактогенности – количество местных и общих реакций, процент (доля) привитых с различными степенями общих и местных реакции;
- безопасности – количественные изменения гематологических показателей и показателей функциональной деятельности различных систем организма (сердечно-сосудистой, выделительной, пищеварительной), которые оценивают на основании данных клинко-лабораторных исследований, показателям инфекционной и соматической заболеваемости в течение 3-6 месяцев с момента вакцинации.

При регистрации местных реакций в ответ на введение изучаемой вакцины учитывают характер реакции (гиперемия, отек, болезненность, кожный зуд, регионарный лимфаденит), выраженность и длительность клинических симптомов.

Общие реакции в ответ на введение вакцины для профилактики бешенства, как правило, проявляются в виде общего недомогания, повышения температуры тела, аллергических реакций немедленного типа (анафилактический шок, отек Квинке, генерализованная сыпь), со стороны центральной нервной системы – головной боли, головокружения, со стороны желудочно-кишечного тракта – тошноты, рвоты, диспепсических расстройств. При регистрации общих реакций следует обращать внимание на выраженность клинических симптомов, их длительность, необходимость назначения симптоматической терапии и госпитализации.

Для изучения безопасности изучаемой вакцины анализируются данные следующих клинко-инструментальных исследований:

- общий анализ крови (уровень гемоглобина, количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, скорость оседания эритроцитов, лейкоцитарная формула);
- биохимический анализ крови (активность ферментов аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы, содержание общего белка, альбумина, белковых фракций сыворотки, холестерина, триглицеридов, глюкозы, общего билирубина);
- анализ крови по иммунологическим показателям (Т-лимфоциты, В-лимфоциты);
- общий анализ мочи (количество, цвет, прозрачность, плотность, белок, глюкоза, микроскопия осадка).

## **II фаза**

Основной целью II фазы клинических исследований вакцин для профилактики бешенства является определение оптимальной дозы и схемы иммунизации.

Дизайн клинического исследования – контролируемое сравнительное рандомизированное исследование с использованием препарата сравнения.

Иммунологическая активность изучаемой вакцины оценивается по показателям:

- серопротекции, который рассчитывается в процентах как отношение числа сывороток с защитными титрами и выше к общему числу исследованных сывороток;
- титрам специфических вируснейтрализующих антител;
- динамике нарастания титров вируснейтрализующих антител.

Для участия в клинических исследованиях отбираются добровольцы, не имеющие в анамнезе курс вакцинации против бешенства.

Критерии включения добровольцев в клиническое исследование:

- отсутствие на протяжении последних 3 месяцев инфекционных заболеваний и эпизодов обострения хронических соматических заболеваний;

- отсутствие на протяжении последних 6 месяцев противовирусной терапии, приема стероидных гормональных препаратов, иммунодепрессантов, иммуномодуляторов.

При испытании вакцин для профилактики бешенства в качестве препарата сравнения используют любую отечественную или иностранную вакцину, зарегистрированную на территории Российской Федерации.

Изучаемую вакцину применяют по схемам профилактической и лечебно-профилактической иммунизации, описываемой выше.

Для изучения выработки специфических вируснейтрализующих антител производится взятие сыворотки у добровольцев в следующие сроки: 0, 14, 28/30, 90, 180, 360 день. В том случае, если на 360 день в сыворотке крови добровольца не выявлен защитный уровень вируснейтрализующих антител, ему назначают 1 бустерную инъекцию с последующим определением уровня вируснейтрализующих антител на 7 день. Результаты определения уровня антител после назначения бустерной инъекции могут свидетельствовать о возможности реализации механизма «иммунологической памяти».

Активность специфических вируснейтрализующих антител – 0,5 МЕ/мл и выше, свидетельствует о достижении защитного уровня иммунитета.

### **III фаза**

Основной задачей этой фазы клинических исследований является изучение выбранной по результатам II фазы испытания оптимальной дозы и схемы иммунизации по показателям иммунологической эффективности, побочного действия и реактогенности. III фазы предполагает проведение контролируемого рандомизированного исследования с использованием препарата сравнения и с шифрованием изучаемых антирабических вакцин и сывороток добровольцев.

Возникновение нижеперечисленных ситуаций в рамках проведения клинического исследования требует прекращения применения изучаемой вакцины:

- обострение хронических заболеваний печени, почек, поджелудочной железы, сердца;
- возникновение во время испытания инфекционных (грипп, ОРВИ, ангина, гепатит) и онкологических заболеваний;
- отказ от участия в испытании;
- любое другое состояние вакцинируемого, которое, по мнению врача-исследователя, может повлиять на течение исследования или на состояние добровольца;
- несоблюдение добровольцем правил участия в клиническом исследовании.

В этом случае доброволец выбывает из клинического исследования.

Следует отметить, что для антирабических вакцин невозможно оценить профилактическую эффективность препарата, что обусловлено, прежде всего, этическими соображениями, так как бешенство характеризуется 100% летальностью в случае развития клинической картины заболевания.

### **IV фаза**

После государственной регистрации вакцины для профилактики бешенства проводится мониторинг показателей эффективности, безопасности и качества.

Задачей этого этапа является изучение лекарственного препарата на большой популяции пациентов в условиях ее рутинного применения.

### **Особенности клинических исследований препаратов иммуноглобулинов для профилактики бешенства**

В случае получения повреждений III категории тяжести пациенту одновременно с первой дозой вакцины для профилактики бешенства назначают иммуноглобулин анти-

рабический с целью создания пассивного иммунитета в первые 2 недели после предполагаемой экспозиции с вирусом бешенства. Необходимость создания пассивного иммунитета определяется, прежде всего, значительной вариабельностью инкубационного периода бешенства, который может длиться от 7 дней до 1 года, иногда до нескольких лет. Учитывая, что выработка собственных антител в ответ на введение вакцины начинается к 12-14 дню, введение антирабического иммуноглобулина как можно раньше после получения повреждения обеспечивает в большинстве случаев эффективную защиту от бешенства при коротком инкубационном периоде.

К III категории повреждения относят любые ослюнения слизистых оболочек, любые укусы головы, лица, шеи, кисти, пальцев рук и ног, гениталий; одиночные или множественные глубокие рваные раны, нанесенные домашними или сельскохозяйственными животными, любые ослюнения и повреждения, нанесенные дикими плотоядными животными, летучими мышами и грызунами.

При изучении безопасности и переносимости иммуноглобулина антирабического, гетерологичный иммуноглобулин вводят внутримышечно (в верхний наружный квадрант ягодичный мышцы) однократно в дозе 40 МЕ на кг массы тела, гомологичный иммуноглобулин – в дозе 20 МЕ на килограмм массы тела.

Наиболее часто в ответ на введение гетерологичного иммуноглобулина регистрируются аллергические реакции немедленного (отек Квинке, анафилактический шок) и замедленного (сывороточная болезнь) типов, местные реакции, проявляющиеся в виде гиперемии, отека и болезненности в месте введения изучаемого препарата. Аллергические реакции на введение гомологичного антирабического иммуноглобулина крайне редки.

Однако, изучение иммунологической и профилактической эффективности антирабических иммуноглобулинов невозможно из-за целого ряда факторов:

- короткий период полураспада иммуноглобулинов (14-21 день),
- применение иммуноглобулина в сочетании с вакциной для профилактики бешенства,
- абсолютная 100% летальность в случае развития клинической картины бешенства.

Таким образом, при изучении возможности внедрения в практику антирабических иммуноглобулинов целесообразно проведение только I и IV фаз клинических исследований.



## ГЛАВА 11

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ОСПЕННЫХ ВАКЦИН

*СОСТАВИТЕЛИ: к. б. н. В.В. Перекрест, д. м. н., проф. А.А. Мовсисянц, к. м. н. Г.А. Ельшина, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, Центр экспертизы и контроля МИБП*

#### Общие положения

Поксвирусы образуют группу давно известных важных патогенов, включающих некоторые зоонозные инфекции, поражающие людей и животных. Несмотря на то, что был начат анализ геномной последовательности представителей ортопоксвирусов, чтобы пролить свет на молекулярные механизмы, лежащие в основе инфекции в клетке-хозяине, знания о репликации вируса, его вирулентности, а также наше понимание сохранения поксвирусов в природе и их передачи человеку по-прежнему являются недостаточными. В последние два десятилетия сообщения о возникновении вспышек оспы обезьян среди людей в Африке, Северной и Южной Америке, в Индии растущее число случаев инфекции, вызванной вирусом коровьей оспы у людей, кошек и экзотических животных напоминают нам о том, что помимо элиминированного вируса натуральной оспы, есть другие поксвирусы, которые способны вызвать инфицирование человека. Диапазон носителей некоторых поксвирусов гораздо шире, чем первоначально считалось. На основе научных исследований появилась гипотеза, согласно которой истинным природным резервуаром вируса оспы коров является не крупный рогатый скот, а различные виды диких грызунов. В последние годы неоднократно сообщалось о случаях заражения людей от домашних кошек оспой коров. Существует мнение о домашних кошках, как о промежуточном хозяине при циркуляции вируса оспы коров. Подтверждены данные о том, что одним из основных природных резервуаров вируса оспы обезьян являются тропические белки. Одним из факторов, вызывающих опасение за эпидемическую обстановку в мире является угроза биотерроризма на фоне понижающегося популяционного иммунитета у людей. Нельзя недооценивать вероятность заражения вирусом натуральной оспы при археологических раскопках, особенно в зонах вечной мерзлоты. Все это вызывает необходимость серьезного подхода к вакцинопрофилактике, диагностике и лечению инфекций у людей, вызванных ортопоксвирусами.

Известно, что живая оспенная вакцина, приготовленная на субстрате животного происхождения, довольно реактогенна и вызывает редкие, но серьезные осложнения, особенно среди людей с иммунодефицитом, атопическим дерматитом и у пожилых людей. Поэтому в настоящее время в мире идут разработки вакцин нового поколения в следующих направлениях:

- смена субстрата животного происхождения на клеточные культуры;
- создание генномодифицированных вакцин;
- комбинированная вакцинация с использованием иммуноглобулина, иммуномодуляторов, фармацевтических препаратов, single-boost вакцинация.

Сложность приготовления вакцины заключается, прежде всего, в том, что необходимо снизить вирулентность вакцинного штамма и, вместе с тем, инициировать иммунный ответ, обеспечивающий выработку защитного уровня специфических антител.

После проведения доклинических испытаний исследуемой оспенной вакцины, при получении удовлетворительных результатов, приступают к клиническим исследованиям.

## Проведение клинических исследований

### I фаза

I этап ограниченных клинических испытаний вновь разрабатываемых оспенных вакцин должен проводиться на добровольцах, ранее не вакцинированных против оспы, на основании разработанного и утвержденного «Протокола ограниченных клинических исследований».

В I фазе клинических исследований определяется переносимость, отработанной в доклинических исследованиях максимальной дозы препарата, безопасность вакцины, а также предварительная информация о ее иммуногенности. Проводится оценка дозировки и способа введения на ограниченной группе добровольцев. I фаза клинических исследований проводится в соответствии с общими требованиями со следующими дополнениями:

1. Критерием включения субъектов в группу волонтеров является:
  - их согласие после письменного информирования;
  - здоровые добровольцы;
  - отсутствие у добровольцев хронических заболеваний носоглотки (при испытаниях пероральных препаратов);
  - масса тела не должна выходить за пределы 20% от «идеальной» массы тела для данного пола, возраста и роста;
  - отсутствие на протяжении 2 месяцев острых соматических, инфекционных заболеваний;
  - добровольцы не должны быть инфицированы ВИЧ;
  - клинико-лабораторные показатели должны находиться в пределах: гематокрит: женщины: от 31% до 45%; мужчины: от 36 до 49%; лейкоциты: от 4000 до 7000 кл/мм<sup>3</sup>; тромбоциты: от 150 000 до 400 000 на мм<sup>3</sup>;
  - отсутствие непереносимости компонентов вакцины;
  - отсутствие иммунопатий;
  - отсутствие в анамнезе тяжелых соматических заболеваний;
  - отсутствие беременности;
  - отсутствие зависимости к алкоголю, лекарственным средствам или наркотическим препаратам;
  - отсутствие психических заболеваний и неврастений;
  - отсутствие предшествующей вакцинации живыми вакцинами в течение 60 дней до начала испытания, инактивированной вакциной в течение 30 дней до начала испытания и прием профилактических препаратов.

2. Критериями выбытия является необходимость прекращения применения препарата вследствие возникновения следующих ситуаций:

- обострение хронических заболеваний печени, почек, поджелудочной железы, сердца;
- возникновение во время испытания инфекционных (грипп и другие ОРВИ, ангина, гепатит и др.), онкологических заболеваний;
- отказ от участия в испытании;
- любое другое состояние испытуемого, которое, по мнению врача-исследователя, может повлиять на течение исследования или состояние пациента;
- несоблюдение пациентом правил участия в исследованиях.

При исследовании новых вакцин необходимо начинать иммунизацию с низкой дозы испытуемой вакцины  $(1,0-4,0) \times 10^6$  ООЕ. При отсутствии побочного действия в течение не менее 14 сут наблюдения за пациентами и после согласования полученных

данных, возможно проведение испытаний высоких доз  $(1-4) \times 10^7$  ООЕ испытуемой вакцины.

Перед прививкой вакцинируемых необходимо проинформировать о правилах поведения в период обследования с целью изучения воздействия факторов, способных повлиять на получаемые результаты (чрезмерные физические нагрузки, употребление алкоголя и др).

Непосредственно перед вакцинацией прививаемые подвергаются термометрии, осмотру врачами: терапевтом, невропатологом, отоларингологом, кардиологом и стоматологом (при клинических испытаниях вакцин для перорального применения). Данные специалисты должны дать заключение об отсутствии противопоказаний к вакцинации. Должна быть проведена оценка уровня гуморального и клеточного иммунитета против натуральной оспы, определены титры антител к вирусу вакцины, что позволит оценить правильность выбора добровольцев для включения в группу испытаний.

Процедура вакцинации должна проводиться под контролем врача-исследователя.

При оральной вакцинации препарат (одну или несколько таблеток) нужно разжевать и держать во рту до полного растворения не менее 3 минут, после чего не рекомендуется пить, курить и принимать пищу в течение 30 минут.

После вакцинации необходимо проводить ежедневный мониторинг клинического состояния пациентов с ежедневной двухкратной термометрией, ежедневный осмотр узкими специалистами и еженедельное определение биохимических и клинических анализов крови и мочи.

Оценку безопасности осуществляют по следующим критериям:

- безопасность вакцины должна оцениваться по результатам наблюдения за привитыми с помощью комплекса клинических и лабораторно-инструментальных методов (термометрии, регистрации артериального давления, аускультации сердца и легких, ЭКГ, общего анализа крови и мочи, биохимического, иммунологического и вирусологического исследований). Обследования необходимо проводить до прививки и через 5 дней после первой прививки и на 14, 21, 30 дни, а также через 3, 6, 9 и 12 месяцев после завершения всей схемы вакцинации;

- оценку реактогенности проводят путем учета количества местных и общих реакций, процента привитых с различными степенями выраженности общих и местных реакций. При этом учитывается подъем температуры тела, недомогание, головная боль, слабость, потливость, нарушения сна и аппетита, тошнота, рвота, боли в животе и др. Местные реакции – гиперемия слизистой, першение, боль в горле, эрозия, увеличение миндалин и регионарных лимфоузлов, после введения таблетированных форм препарата учитываются врачом-исследователем, который должен наблюдать пациента в течение 21 суток.

Также оценивается возможность выделения вируса в окружающую среду волонтерами, привитыми оспенной вакциной путем определения его наличия в специфических кожных образованиях, в плазме, слюне и моче в течение 14 дней (так называемая неконтролируемая передача вируса вакцины не привитым людям).

При накожной и внутрикожной вакцинации (методами скарификации и множественного накалывания), возможно, и при других методах введения вакцинальный процесс протекает с образованием в месте введения вакцины специфической реакции, вакцинальных элементов: папулы, пустулы, везикулы. Окончательный учет результатов вакцинации проводят на 8 сутки после введения вакцины. Вакцинация считается успешной при развитии пустулы, везикулы. При других методах введения исследуемой вакцины учет результатов вакцинации должен быть определен во время испытаний.

Определение эффективности оспенных вакцин проводится по следующим критериям:

- иммунологическая эффективность вакцины определяется по проценту привитых с титром вируснейтрализующих антител к вирусу вакцины в реакции нейтрализации на куриных эмбрионах  $\geq 1:40$ . Также иммунологическую эффективность характеризует активность ГЗТ-эффекторов к специфическому антигену – вирусу вакцины и митогенам;

- иммунологическая активность оценивается по титру антител к вирусу вакцины в образцах парных сывороток до, через 1, 3, 6, 9 и 12 месяцев после завершения всей схемы вакцинации;
- клеточно-опосредованный иммунитет определяется методом оценки активности ГЗТ-эффекторов к встроенным в геном вируса вакцины антигенам (рекомбинантные вакцины) по репродукции факторов распластывания и ингибирования миграции *in vivo* в образцах крови привитых людей (до и через 1 и 3 месяцев после первого введения испытуемой вакцины);
- эффективность защиты исследуемой вакцины определяется путем проведения накожной прививки живой оспенной вакциной не менее чем через 1-2 месяца после вакцинации.

*Оценка противооспенного иммунитета по выраженности местной специфической кожной реакции при ревакцинации вакциной оспенной*

Местная специфическая кожная реакция		Оценка иммунитета
Тип реакции	Клинические проявления	
Первичная вакцинальная	На 4 день появляются покраснение вдоль надрезов, небольшой инфильтрат и папулы. При отсутствии выраженных изменений на 3-4 день, продолжают наблюдение до 7-8 дня. При наличии на 7-8 день плоских везикул и пустул, окруженных зоной гиперемии и инфильтрации тканей, реакция учитывается как первичная вакцинальная	Отсутствие иммунитета
Ускоренная вакцинальная	На 2 день появляются везикулы, окруженные зоной гиперемии и инфильтрации тканей или без них. На 4 день изменения более выражены	Сниженный иммунитет
Немедленная реакция	На 2-3 день появляются папулы, окруженные зоной гиперемии или без нее, или эритема и уплотнения	Напряженный иммунитет
Отрицательная реакция	На месте прививки кроме травматической реакции на надрезы не развиваются ни вакцинальные элементы, ни эритема, ни уплотнения	

Привитых исследуемой вакциной и имеющих вируснейтрализующие антитела не менее 1:40, ревакцинируют согласно «Инструкции по применению» вакциной оспенной живой тремя надрезами, а лиц с титрами менее 1:40 – двумя надрезами. Развитие местной специфической реакции регистрируют ежедневно, определяя размеры гиперемии, инфильтрата, везикул и пустул в течение не менее 8 суток. Учет выраженности местной специфической кожной реакции проводят по всем надрезам, а оценку противооспенного иммунитета – по надрезу с наиболее выраженной кожной реакцией, что показано в таблице.

## II фаза

После завершения I фазы клинических исследований и получения удовлетворительных результатов в отношении переносимости и безопасности приступают ко II фазе клинических исследований. Вторая фаза проводится с участием большего количества

пациентов (100-150 чел.), рандомизированное параллельно с контрольной группой добровольцев, получающих плацебо.

Целью второй фазы исследования является изучение эффективности вакцины, подтверждение безопасности выбранной дозы и схемы вакцинации.

Через 28 дней после начала исследования у лиц обеих групп проводится забор крови. В образцах сывороток крови определяют показатели гуморального иммунитета в реакции нейтрализации на ХАО КЭ и оценивают эффективность защиты исследуемой вакцины.

Испытания II фазы являются наиболее важным этапом, необходимым для принятия решения о продолжении разработки нового препарата.

### **III фаза**

На основании полученных удовлетворительных данных возможно проведение III фазы клинических исследований, которая представляет собой тщательно контролируемые широкомасштабные клинические исследования с использованием плацебо или референтных препаратов, направленные на получение дополнительных данных по эффективности и безопасности вакцины. Данные исследования проводятся по общепринятым правилам, описанным в руководстве с учетом специфики применения оспенных вакцин, описанной выше. Третья фаза клинических исследований проводится в подтверждение результатов и выводов второй фазы исследований при этом продолжается изучение показателей безопасности, исследуются разновидности наиболее часто встречающихся побочных реакций.

При вакцинации оспенной вакциной наряду с обычно регистрируемыми местными и общими реакциями могут возникнуть необычные и в том числе тяжелые поствакцинальные осложнения (поражения кожи, осложнения аллергической природы, обострения различных хронических заболеваний, поражение центральной нервной системы вплоть до энцефалитов). Их частота, по данным разных авторов, колеблется в пределах от 0,1 до 7 на сто тысяч привитых. Наиболее тяжелое из осложнений – поствакцинальный энцефалит – регистрируется в среднем 4 случая на один миллион первично вакцинированных. Учитывая изложенное, изучение частоты и характера поствакцинальных осложнений среди первично привитых возможно лишь в наблюдениях за тысячами, а выявление различий в частоте поствакцинальных энцефалитов – за миллионами первично привитых.

### **IV фаза**

Постмаркетинговые исследования серий вакцины являются IV фазой клинических исследований. Как правило, это широкомасштабные многоцентровые рандомизированные, двойные слепые исследования, которые позволяют оценить реактогенность оспенной вакцины на большом количестве привитых, чтобы выявить частоту и характер поствакцинальных реакций, присущих оспенной вакцине. Кроме того, эти исследования позволяют провести сравнительные (отборочные) испытания вакцин, приготовленных из различных оспенных штаммов с целью выбора наиболее иммуногенного и менее реактогенного. Примером IV фазы клинических исследований является выбор штамма Л-ИВП для производства живой оспенной вакцины в результате проведения сравнительных исследований вакцин, изготовленных из трех различных оспенных штаммов (ЭМ-63, Б-51 и Л-ИВП). Было вакцинировано 665 тысяч детей в регламентированный календарный срок. Результаты исследования позволили провести сравнительную оценку реактогенности и иммуногенности вакцин, изготовленных из трех различных оспенных штаммов.

## ГЛАВА 12

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАКЦИН ПРОТИВ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

*СОСТАВИТЕЛЬ: к. м. н. Т.И. Немировская, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразви-  
тия России, Центр экспертизы и контроля МИБП*

Единственным и наиболее экономичным способом существенно повлиять на заболеваемость пневмококковой инфекцией является вакцинация. По антигенным характеристикам полисахаридной капсулы пневмококки подразделяют более чем на 90 серотипов. В 1999 г. в России была зарегистрирована вакцина Пневмо 23 производства Санофи Пастер (Франция), в состав которой включены полисахариды 23-х наиболее вирулентных серотипов пневмококка. Эта вакцина применяется для профилактики инфекций пневмококковой этиологии у лиц старше 2-х лет. Пневмо 23 особенно показана лицам из числа групп риска: старше 65 лет, ослабленным или часто госпитализируемым, а также находящимся в домах престарелых. Вакцина Пневмо 23 – эффективный и безопасный препарат, однако она, как и все полисахаридные вакцины, содержит Т-клеточнонезависимые антигены, в связи с чем неспособна к стимуляции иммунного ответа у детей до 2-летнего возраста и формированию иммунной памяти. Для преодоления недостаточной иммуногенности полисахаридных вакцин используют технологию протеиновой конъюгации. При этом каждый из полисахаридов, входящих в состав такой вакцины, ковалентно конъюгирован с белковым носителем. В контролируемых клинических испытаниях показано, что конъюгированные пневмококковые вакцины, благодаря содержанию Т-клеточнозависимых антигенов, обеспечивают высокий уровень протективности против инвазивной пневмококковой инфекции у маленьких детей, индуцируют иммунологическую память и освобождают от носительства пневмококков, соответствующего серотиповому составу вакцины. Пневмококковая конъюгированная вакцина Превенар производства компании Вайет (США) содержит 7 серотипов пневмококка: 4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F, 23F. Эта вакцина входит в национальные календари прививок большинства зарубежных стран. Помимо прямого эффекта от применения Превенара в виде снижения заболеваемости детей пневмококковой инфекцией, вызванной серотипами, входящими в состав вакцины, отмечен и опосредованный эффект: значительное снижение заболеваемости, обусловленной пневмококками, у лиц старше 65 лет, контактных с привитыми детьми. Постмаркетинговая оценка безопасности и иммуногенности вакцины Превенар, вводимой одновременно с вакцинами календаря прививок с 2-месячного возраста, продемонстрировала значительное снижение заболеваемости пневмококковой этиологии (менингитов, пневмоний и острых отитов). При этом было отмечено выработка полноценного иммунного ответа на антигены, содержащиеся в других детских вакцинах. В России вакцина Превенар разрешена к медицинскому применению с 2009 г. Внедрение препарата Превенар в практику отечественного здравоохранения позволит защитить от пневмококковой инфекции детей наиболее уязвимого возраста: до 5 лет. Однако в последние годы стало наблюдаться некоторое замещение «вакцинных» серотипов пневмококка серотипами, не входящими в состав вакцины, и в том числе, антибиотикорезистентными 6А и 19А,

что обусловило необходимость расширения серотипового состава вакцины Превенар. В США и странах Европы закончены клинические испытания 13-валентной пневмококковой полисахаридной конъюгированной вакцины Превенар 13, содержащей 6 дополнительных серотипов: 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A. По данным международных исследований серотипы пневмококка, входящие в состав вакцины Превенар 13, ответственны за 90% случаев инвазивных пневмококковых инфекций в мире.

В связи с тем, что при проведении клинических испытаний вакцины Превенар помимо иммуногенной активности была доказана и ее протективная эффективность против пневмококковых инфекций, ВОЗ рекомендует, чтобы иммуногенность новых пневмококковых вакцин в рандомизированных контролируемых испытаниях непосредственно сравнивали с иммунным ответом на вакцину Превенар. Кроме того, рекомендациями ВОЗ предусмотрено проведение испытаний иммуногенности вновь разрабатываемых пневмококковых вакцин на основе изучения серотип-специфического ответа.

Исследование иммунного ответа на серотип-специфические IgG антитела методом ELISA основано на связывании полисахаридов, входящих в состав вакцины. При постановке данной реакции обязательно использование стандартных образцов антигенов и сывороток. При апробации альтернативных методов оценки иммунного ответа на введение пневмококковых вакцин следует учитывать необходимость их корреляции с концентрацией антител в 0,35  $\mu\text{g}/\text{мл}$ , определенных в ELISA. Такая концентрация принята в качестве общепризнанного защитного уровня антител против пневмококковой инфекции. Таким образом, при проведении испытаний иммуногенности новых пневмококковых вакцин в первую очередь следует ориентироваться на концентрацию IgG антител. Дополнительные исследования должны включать определение титров серотип-специфических функциональных антител в опсоно-фагоцитарной реакции. Принято считать, что наличие титров в опсоно-фагоцитарной реакции  $\geq 1:8$  указывает на присутствие функциональных антител, однако высота значений титров, гарантирующих защиту от определенных серотипов, еще не определена.

Иммунный ответ на пневмококковые конъюгированные вакцины может варьировать от схемы применения, популяции прививаемого контингента и антигенного состава вакцины. Не представляется возможным проводить изучение новой вакцины, используя все возможные схемы применения при массовом охвате большого географического региона. Также весьма затруднительно проведение испытаний эффективности новой вакцины с учетом совместного ее введения с вакцинами календаря прививок. В частности, иммунный ответ на вакцину, вводимую с интервалом в 2, 3 и 4 месяца, будет, как правило, ниже, чем при ее же введении с интервалом в 2, 4 и 6 месяцев. В то же время, в зависимости от схемы применения препарата, будут отличаться и результаты исследования местной и общей реактогенности. При апробации новых пневмококковых вакцин в клинических испытаниях необходимо проводить у привитых изучение первичного иммунного ответа после введения 2 доз (что по разным схемам применения приходится на возраст младенцев в 2 и 4 месяца или в 3 и 5 месяцев). Такое решение объясняется тем, что нередко новые пневмококковые вакцины обеспечивают достаточный иммунный ответ уже после второй дозы препарата и нет необходимости введения третьей дозы. Результаты первичного курса иммунизации, основанные на измерении IgG антител, должны быть получены спустя 4 недели после завершения цикла иммунизации. На этом этапе должно быть показано получение достоверного иммунного ответа на каждый серотип, входящий в состав вакцинного кандидата. Критериями оценки их иммуногенности являются два показателя: процент привитых с содержанием IgG антител  $\geq 0,35 \mu\text{g}/\text{мл}$ , а также концентрация сероспецифических IgG антител.

Кроме того, важными аспектами для клинического изучения новых пневмококковых вакцин могут служить исследования авидности продуцируемых антител, а также влияния вакцинации на назальное носительство пневмококков.

Программы клинического изучения новых конъюгированных вакцин против пневмококковой инфекции должны содержать этапы исследования, подтверждающие возможность формирования у привитых детей иммунологической памяти. Применение 7-валентной вакцины Превенар в развитых странах предполагает введение 2-х или 3-х доз вакцины на первом году жизни ребенка с последующей бустер-иммунизацией на втором году жизни (начиная с 12 месяцев). Протокол клинических испытаний новых вакцин против пневмококковой инфекции должен включать изучение бустер-ответа на ее введение в сравнении с бустер-ответом на лицензированную вакцину. Оптимальный срок для ревакцинации строго не определен. В большинстве случаев принято, что бустер-дозу следует вводить спустя 6 месяцев после завершения курса первичной иммунизации. Как правило, время ревакцинации приходится на возраст ребенка между 12 и 24 месяцами. Желательно, хотя и сложно выполнимо, чтобы программа изучения новых вакцин против пневмококковой инфекции предусматривала определение оптимальных сроков введения бустер-дозы в разные сроки спустя проведения полного курса первичной иммунизации. Однако реализация таких исследований возможна и после лицензирования новой вакцины.

Важное значение при клиническом изучении новых пневмококковых конъюгированных вакцин имеет иммунный ответ на белковый носитель. Отмечено, что использование в качестве белковых конъюгатов дифтерийного или столбнячного анатоксина, а также нетоксичного дифтерийного мутанта CRM197, вызывает увеличение специфических антитоксических антител, но не способно заменить плановую иммунизацию против дифтерии или столбняка. Однако совместное введение новых пневмококковых конъюгированных вакцин с вакцинами календаря прививок, содержащих дифтерийный и столбнячный анатоксины, может привести к выработке высокого антитоксичного иммунитета. В этой связи особое внимание следует обратить на возможное повышение реактогенности одновременно вводимых вакцин.

Специальному изучению должны быть подвергнуты вопросы безвредности и иммуногенности пневмококковых конъюгированных вакцин при их совместном введении с другими вакцинными препаратами. Одновременное введение разных вакцин, содержащих одинаковые белковые конъюгаты, может привести к снижению иммунного ответа на один или несколько антигенов (т.е. к иммунной интерференции). При разработке протокола исследования иммуногенности и реактогенности нескольких вакцинных препаратов при их совместном введении следует заранее предусмотреть антиген-специфичные критерии приемлемости иммунного ответа на все совместно вводимые антигены.

В настоящее время остаются не до конца решенными вопросы, связанные с необходимостью введения бустер-дозы для обеспечения длительного иммунного ответа на все серотипы, входящие в состав конъюгированной пневмококковой вакцины. Необходимость дополнительной иммунизации зависит от целого ряда факторов, таких как утрата естественного повышения иммунитета вследствие низкого уровня циркуляции некоторых, либо всех серотипов, входящих в состав вакцины, уровня заболеваемости, вызванной тем или иным серотипом, а также от состояния популяционного иммунитета. Кроме того, для выяснения эффекта от вакцинации крайне важно определение уровня заболеваемости пневмококковой этиологии, вызванных невакцинными серотипами, что поможет либо подтвердить положительный эффект от вакцинации, либо получить доказательство, что вакцинация повлекла за собой замену циркулирующих серотипов на новые, не входящие в состав пневмококковой вакцины.



## ГЛАВА 13

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ВАКЦИН

*СОСТАВИТЕЛИ: акад. РАМН А.Л. Гинцбург, акад. РАМН В.В. Ерохин, д. м. н. М.Ю. Чернуха, д. б. н. проф. Б.С. Народицкий, д. б. н. проф. А.С. Ант, к. м. н. Л.Р. Аветисян, д. б. н. Д.Ю. Логунов, д. б. н. Т.К. Кондратьева, д. б. н. В.Г. Лукин, к. б. н. А.П. Ткачук, Н.Е. Филиппова, С.И. Савочкина, И.П. Исачкова, Ю.С. Сазонов, ФГБУ «НМИИ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России*

#### Введение

Клиническое исследование/испытание – любое исследование, проводимое с участием человека в качестве субъекта для выявления или подтверждения клинических, фармакологических и/или иных фармакодинамических эффектов исследуемого продукта(ов); и/или выявления нежелательных реакций на исследуемый(ые) продукт(ы), и/или изучения его (их) всасывания, распределения, метаболизма и выведения для проверки его (их) безопасности и/или эффективности. Термины «клиническое испытание» и «клиническое исследование» являются синонимами (Guideline for Good Clinical Practice).

Клинические исследования во всем мире являются неотъемлемым этапом разработки препаратов, которые предшествуют его регистрации и широкому медицинскому применению. В ходе клинических исследований новый препарат изучается для получения данных о его эффективности и безопасности. На основании этих данных уполномоченный орган здравоохранения принимает решение о регистрации препарата или отказе в регистрации. Препарат, не прошедший клинических исследований, не может быть зарегистрирован и выведен на рынок.

При разработке нового препарата невозможно обойтись без клинических исследований, поскольку экстраполяция результатов доклинических исследований на человека возможна только в общем виде, а иногда невозможна.

Клинические исследования могут быть инициированы только после того, как получены результаты доклинических исследований безопасности и эффективности препаратов.

До начала клинического исследования должна быть проведена оценка соотношения предсказуемого риска с ожидаемой пользой для испытуемого и общества. На первое место ставится принцип приоритета прав, безопасности и здоровья испытуемого над интересами науки и общества. Клиническое исследование должно быть научно обосновано и подробно описано в протоколе исследования. Оценка соотношения рисков и пользы, а также рассмотрение и одобрение протокола исследования и другой документации, связанной с проведением клинических исследований, входят в обязанности Экспертного Совета Организации / Независимого Этического Комитета (ЭСО/НЭК). После получения одобрения от ЭСО / НЭК можно приступить к проведению клинического исследования.

#### Протокол клинического исследования

Любое клиническое исследование начинается с разработки протокола. Это главный документ клинического исследования, который описывает цель, задачи, дизайн, методологию, статистические аспекты и организацию исследования.

В составлении протокола клинического исследования противотуберкулезных вакцин должен участвовать ряд специалистов: микобактериологи, специалисты по

доклиническим испытаниям, специалисты по клиническим исследованиям, эпидемиологи, иммунологи, специалисты по биомедицинской статистике, специалисты по вакцинам, врачи фтизиатры, врачи исследователи. Протокол — это инструкция для врачей, проводящих исследование. Врачи-исследователи обязаны строго следовать протоколу. Мультицентровые клинические исследования всегда проводятся по единому протоколу.

По общему правилу, содержание протокола исследования должно иметь указанную ниже структуру. Однако информация, имеющая отношение только к одному исследовательскому центру, может быть представлена на отдельных страницах протокола или содержаться в отдельном соглашении, а часть приведенной ниже информации может также содержаться в других документах, ссылки на которые имеются в протоколе, например в брошюре исследователя.

#### Общая информация

- название протокола, идентификационный номер протокола и дата, любая поправка также должна иметь номер поправки и дату;
- наименование/имя и адрес спонсора и монитора (если они различаются);
- имя и должность лиц, уполномоченных от имени спонсора подписывать протокол и поправки к протоколу;
- имя, должность, адрес и номер телефона назначенного спонсором медицинского эксперта по данному исследованию;
- имя и должность исследователей, отвечающих за проведение исследования, а также адреса и номера телефонов клинических центров;
- имя, должность, адрес и номер телефона квалифицированного врача, отвечающего за принятие всех решений медицинского характера (если данное лицо не является исследователем);
- наименования и адреса клинических лабораторий и других медицинских и/или технических служб и/или организаций, вовлеченных в исследование.

#### Обоснование исследования

- название и описание исследуемых продуктов;
- сводное изложение потенциально имеющих клиническую значимость результатов доклинических исследований, а также результатов клинических исследований, значимых для данного исследования;
- краткое описание известных и потенциальных рисков и пользы для субъектов исследования, если таковые имеются;
- описание и обоснование способа введения, дозировки, режима дозирования и курса лечения;
- указание на то, что исследование будет проводиться в соответствии с протоколом, GCP и нормативными требованиями;
- описание исследуемой популяции;
- ссылки на литературные источники и данные, существенные для исследования и представляющие собой обоснование данного исследования.

#### Цели и задачи исследования

Детальное описание целей и задач исследования.

#### Дизайн исследования

Научная обоснованность исследования и достоверность полученных в исследовании данных существенно зависят от дизайна исследования. Описание дизайна исследования должно включать в себя:

- указание основных и дополнительных (при наличии) исследуемых параметров, которые будут оцениваться в ходе исследования;
- описание типа/дизайна проводимого исследования (например, двойное слепое, плацебо-контролируемое, параллельное) и графическую схему дизайна исследования, процедур и этапов исследования;

- описание мер, направленных на минимизацию/исключение субъективности, в том числе:

- а) рандомизации;

- б) слепого метода/маскировки;

- описание используемого в исследовании лечения, дозировки и схемы применения исследуемых продуктов. Также включает в себя описание лекарственной формы, упаковки и маркировки исследуемых продуктов;

- ожидаемая продолжительность участия субъектов в исследовании, описание последовательности и продолжительности всех периодов исследования, включая период последующего наблюдения, если таковой предусмотрен;

- описание «правил остановки» или «критериев исключения» для отдельных субъектов, частей исследования или исследования в целом;

- процедуры учета исследуемых продуктов, включая, при наличии, плацебо и препараты сравнения;

- хранение рандомизационных кодов и процедуры их раскрытия;

- перечень всех данных, регистрируемых непосредственно в ИРК (т.е. без предварительной записи в письменном или электронном виде) и рассматриваемых в качестве первичных данных.

Отбор и исключение субъектов

Критерии включения субъектов.

Критерии исключения субъектов (т.е. основания прекращения применения исследуемого продукта/исследуемого лечения), а также процедуры, определяющие:

- а) когда и как субъектов исключать из исследования/лечения исследуемым продуктом;

- б) какие данные и в какие сроки должны быть собраны по исключенным пациентам;

- в) заменены ли и каким образом выбывшие субъекты;

- г) последующее наблюдение за субъектами, исключенными из лечения исследуемым продуктом/исследуемым лечением.

Лечение субъектов

1. Осуществляемое лечение, включая названия всех продуктов, их дозировки, частоту приема, пути/способы введения, а также продолжительность лечения, включая периоды последующего наблюдения для каждой группы лечения исследуемыми продуктами.

2. Лекарства/способы лечения, применение которых разрешено (включая неотложную терапию) или не разрешено до и/или во время исследования.

3. Методы контроля за соблюдением процедур субъектами.

Оценка эффективности

1. Перечень параметров эффективности.

2. Методы и сроки оценки, регистрации и анализа параметров эффективности.

Оценка безопасности

1. Перечень параметров безопасности.

2. Методы и сроки оценки, регистрации и анализа параметров безопасности.

3. Требования к отчетам, процедуры по регистрации и сообщениям о нежелательных явлениях и интеркуррентных заболеваниях.

4. Метод и продолжительность наблюдения за субъектами после возникновения нежелательных явлений.

Статистика

1. Описание статистических методов, которые предполагается использовать, включая сроки каждого планируемого промежуточного анализа.

2. Планируемое количество субъектов. В случае многоцентровых исследований должно быть определено планируемое количество субъектов в каждом центре.

3. Обоснование размера выборки, включая рассуждения или вычисления для обоснования статистической мощности исследования и клинической правомерности исследования.

4. Применяемый уровень значимости.

5. Критерии прекращения исследования.

6. Процедуры учета отсутствующих, не подлежащих анализу и сомнительных данных.

7. Процедуры сообщения о любых отклонениях от первоначального статистического плана (все отклонения от первоначального статистического плана должны быть описаны и обоснованы в протоколе и/или финальном отчете об исследовании).

8. Отбор субъектов для анализа (например, все рандомизированные субъекты, все субъекты, получившие хотя бы одну дозу исследуемого препарата, все субъекты, соответствующие критериям отбора, субъекты, данные которых пригодны для оценки).

Прямой доступ к первичным данным/документации

Спонсор должен предусмотреть в протоколе или ином письменном соглашении обязанность исследователей/организаций не препятствовать прямому доступу к первичным данным/документации для проведения связанных с исследованием мониторинга, аудита, этической экспертизы, а также инспекции со стороны уполномоченных органов.

Контроль качества и обеспечение качества

Этика

Описание этических аспектов исследования.

Работа с данными и ведение записей

Финансирование и страхование

Финансирование и страхование, если они не описаны в отдельном договоре.

Публикации

Политика в отношении публикаций, если она не описана в отдельном договоре.

Приложения

### **Брошюра исследователя**

Брошюра исследователя (БИ) представляет собой сводное изложение клинических и доклинических данных по исследуемому продукту, которые имеют значение для его изучения с участием человека в качестве субъекта исследования. Назначением БИ является предоставление исследователям и другим лицам, вовлеченным в проведение исследования, информации о дозах, частоте/периодичности введения доз, способах введения, а также процедурах мониторинга безопасности. БИ также обеспечивает правильное клиническое ведение субъектов в течение курса клинического исследования. Информация должна быть представлена в краткой, простой, объективной, взвешенной и лишенной рекламного оттенка форме, позволяющей клиницисту или потенциальному исследователю понять ее и сформировать свою собственную объективную оценку целесообразности предлагаемого исследования, исходя из соотношения риска и пользы.

Клинические испытания противотуберкулезных вакцин являются *интервенционными*. Интервенционное исследование — исследование новых, незарегистрированных лекарственных препаратов, иммунобиологических средств, медицинской техники, либо исследование, в котором лекарственные препараты, иммунобиологические средства, медицинская техника назначаются или применяются способом, отличным от условий, изложенных в зарегистрированной инструкции по применению (будь то новое показание, новая дозировка препарата, новый путь введения, новый способ применения или же новая категория пациентов).

## Дизайн исследования

Дизайн исследования — это общий план исследования, описание того, как исследование будет проводиться (Мелихов О.Г. Клинические исследования. М.: Атмосфера, 2003. 200 с.)

Эталонным методом дизайна клинических исследований являются рандомизированные контролируемые двойные слепые исследования.

В рандомизированном исследовании пациенты, прошедшие критерии включения, распределяются по группам случайным образом (например, с помощью таблицы случайных чисел или последовательности случайных чисел, генерируемой компьютером). Процедура рандомизации исключает какой-либо сознательный или несознательный отбор пациентов в конкретную группу по тем или иным критериям (то есть исключается влияние как субъективности исследователей, так и систематической ошибки). Таким образом, каждый пациент имеет такой же шанс получить исследуемый или контрольный препарат (или плацебо), как и любой другой участник исследования. В нерандомизированном исследовании, соответственно, процедура рандомизации не проводится.

Слепой/маскированный метод — метод, при применении которого одной или более участвующим в клиническом исследовании сторонам неизвестно, какое лечение назначено субъекту исследования. Простой слепой метод предусматривает неосведомленность о назначенном им виде лечения субъектов исследования, в то время как двойной слепой метод подразумевает неосведомленность субъектов исследования, исследователей, мониторов и, в некоторых случаях, лиц, выполняющих статистическую обработку данных.

В контролируемых исследованиях лекарственный препарат изучается параллельно с «контрольным средством». В качестве «контроля» может выступать плацебо (плацебо-контролируемое исследование) или препарат/препараты сравнения (сравнительное исследование). Часто также практикуется сравнение с тем же препаратом, но в другой дозе (с другим режимом приема), иногда — с группой, не получавшей никакого лечения (в том числе и плацебо).

Неэтичным является применение плацебо для изучения эффективности в эндемичных районах по туберкулезу особенно у детей. В этом случае надо проводить сравнительное исследование, применяя другие существующие лицензированные противотуберкулезные вакцины.

Дизайн (план, структура) исследований может быть простым и сложным. Существуют несколько наиболее часто используемых вариантов стандартных дизайнов: клиническое исследование в одной группе (single group design), в параллельных группах (parallel group design), в «перекрестной модели» (crossover group design).

Исследование в одной группе — самый простой вариант дизайна, все участники исследования получают один и тот же препарат. Целью такого исследования является сравнение результатов лечения с исходным состоянием пациентов. Как правило, клинические исследования с таким дизайном широко используются в I фазе исследований нового лекарственного препарата, и на основе полученных результатов (если они благоприятны) планируются более сложные исследования, позволяющие получить более достоверные данные. Однако исследования в одной группе сами по себе не могут быть основанием для окончательных выводов об эффективности или безопасности препарата и тем более — для практических рекомендаций по его применению в медицинской практике.

Клиническое исследование в параллельных группах может включать две группы пациентов и более. Это классический дизайн для плацебо-контролируемого исследования. Кроме того, в таких исследованиях изучаются разные препараты в сравнении друг с другом и/или с плацебо, один и тот же препарат в разных дозах или с разными режимами введения и т.д. Оптимально, если при этом распределение на группы будет случайным

(рандомизация), а контроль будет проводиться методом слепого исследования. Большинство клинических испытаний проводятся в дизайне параллельных групп, поскольку именно такой дизайн обеспечивает получение максимально объективных выводов.

В зависимости от количества исследовательских центров (клиник), в которых проводится наблюдение за больными, участвующими в исследовании, клиническое исследование может быть одноцентровым и многоцентровым. Чем больше центров участвует в исследовании, тем меньше вероятность ошибок в результатах исследования.

Выбор дизайна зависит от цели клинического исследования.

Отбор испытуемых зависит от разных факторов, в том числе от фазы исследования, от конечной цели клинического исследования, в каких возрастных группах должна применяться вакцина, в каких регионах и других факторов. Исследователи перед началом клинического исследования должны определить критерии включения, невключения субъектов в исследование, а также критерии исключения.

Испытуемый может быть включен в исследование только на основании добровольного информированного согласия, полученного после детального ознакомления с материалами исследования.

В беседе с врачом-исследователем доброволец должен получить следующую информацию:

- цель исследования;
- наличие разрешения на проведение исследования;
- длительность исследования;
- условия, в которых будет находиться доброволец во время исследования;
- ограничения в приеме лекарств во время исследования;
- возможные нежелательные реакции;
- возможность оказания медицинской помощи во время и после исследования.

Участие детей в исследовании возможно только после получения информированного согласия, подписанного родителями ребенка. Форма информированного согласия одобрена Комитетом по этике при Федеральном органе контроля качества лекарственных средств.

После подписания информированного согласия заводится индивидуальная карта, проводится клиническое и параклиническое обследование добровольцев, включающее врачебный осмотр с учетом особенностей ожидаемого действия изучаемой вакцины.

Результаты обследования заносятся в индивидуальные карты добровольцев. По результатам клинического осмотра и лабораторных тестов врач-исследователь делает заключение, на основании которого доброволец допускается или не допускается к исследованию.

Количество людей, включенных в исследование, зависит от фазы. Первая фаза включает 20-80, вторая – 200-300, третья фаза – от 7000 до 300 000 человек.

### **Фазы клинического исследования**

Клиническое испытание вакцин состоит из 4 фаз.

*Первая фаза клинического исследования* – это испытания новой вакцины (компонента) с участием здоровых добровольцев.

**Цель** заключается в получении предварительных данных по безопасности и переносимости препарата.

Общие положения, касающиеся I фазы:

1. Определение целей исследования. Первичной целью является проверка безопасности и переносимости, а второй – предварительная оценка иммуногенности.
2. Постоянный мониторинг исследований безопасности.
3. Включение в группу испытуемых только взрослых. В последующие испытания включают детей, затем иммунокомпрометированных людей, в частности ВИЧ-инфицированных. Исследования по безопасности должны проводиться как с участием людей, имеющих положительную туберкулиновую пробу, так и отрицательную.

4. Включение в исследование небольшого числа испытуемых лиц (20-80 чел.).

5. Обеспечение специальными инструкциями по применению вакцин.

При планировании исследований фазы I необходимо:

- помнить об особенностях вакцины (например, живая вакцина);
- разработать критерии включения и невключения. Например, для I фазы рекомендуется включать здоровых добровольцев от 18 до 40 лет;
- определить дополнительные специфические критерии или характеристики, такие как возраст, серологический статус, допускаемые к применению сопутствующие медикаменты и другие факторы.

Дозы и схему введения вакцины определяют на основании данных, полученных в доклинических испытаниях.

Если исследованиями подтверждается безопасность и хорошая переносимость вакцины, клиническое испытание переходит во II фазу.

Переход первой фазы во вторую возможен при следующих условиях:

1. Вакцина должна быть безопасной.
2. Иммуногенность новой вакцины должна быть более выраженной, чем вакцины БЦЖ.
3. Вакцина не должна ингибировать Т-клеточный ответ.
4. Определены доза и схема введения вакцины.

II фаза требует включения большего количества испытуемых – 200-300 человек. Целью II фазы является оценка иммуногенности, а также безопасности вакцин. Мониторинг безопасности должен более точно определить общие тенденции в развитии нежелательных реакций, местной реакции и системных воздействий. В этой фазе проверяется частота возникновения неблагоприятных реакций, изучается степень и характер ответа на различные дозы, вводимые по разным схемам. Исследуется также характер иммунологических реакций, вызываемых вакцинацией. К ним относятся Т-клеточные пролиферативные реакции на антиген, продукция лимфокинов, цитотоксические Т-клетки и антитела к специфическим антигенам возбудителя. Иммунный ответ на введенную вакцину оценивается и качественно и количественно. В результате испытаний фазы II должны быть получены иммунологические показатели, которые могут рассматриваться в качестве маркеров протективности в последующих клинических испытаниях.

Во II фазе клинических испытаний применяется обычно рандомизированный контролируемый тип исследований.

Если препарат эффективен и безопасен во II фазе, он исследуется в фазе III.

*Клинические испытания III фазы* представляют собой контролируемые исследования, спланированные для определения безопасности и эффективности препарата в условиях, приближенных к тем, в которых он будет использован в случае его разрешения к медицинскому применению.

III фаза является крупномасштабным исследованием и включает, в случае противотуберкулезных вакцин от 7000 до 300 000 человек. Необходимо проводить III фазу испытаний с участием групп населения, характеризующихся высокой частотой встречаемости туберкулеза ( $>0,5\%$  в год) и заболеваемости им. В зависимости от задач конкретного исследования на этой фазе проводят контролируемые исследования с плацебо, референс-препаратом или стандартным препаратом. Испытания могут быть как слепыми, так и открытыми.

Были предложены 3 различные схемы проведения III фазы испытаний противотуберкулезных вакцин.

Доинфекционное исследование вакцин. Испытание вакцины проводят у лиц (детей или молодых людей), имеющих отрицательную туберкулиновую реакцию, ранее не инфицированных туберкулезной палочкой. Целью этого исследования является оценить возможность профилактики первичной инфекции, предотвращения перехода от инфицирования до развития заболевания, а также развития латентной или персистирующей инфекции.

Недостатком является то, что для исчерпывающей оценки эффективности новой вакцины против туберкулеза у взрослых потребуется 20-30 лет.

Постинфекционное исследование вакцины. Этот метод применим по отношению к населению с повышенным риском развития активной формы туберкулеза, а также к тем, кто уже инфицирован туберкулезной палочкой. Частота случаев перехода инфекции в активную форму заболевания в некоторых странах может достигать 3%-5% в год. Таким образом, пользуясь указанной стратегией можно оценивать эффективность вакцины через 5-10 лет. Однако неизвестно, сможет ли иммунный ответ, вызванный вакцинацией, препятствовать развитию заболевания у инфицированных туберкулезной палочкой, или обеспечить выздоровление лиц с латентными или перистирующими формами инфекции.

Исследование вакцины среди населения. Это стратегия испытания вакцины на ее эффективность с участием всего населения в регионах с повышенным риском заражения, которая сочетает в себе преимущества вышеуказанных стратегий.

*IV фаза клинических испытаний.* Проводится после регистрации препарата. Это, так называемые, постмаркетинговые испытания, которые проводятся на очень большом количестве участников и используются для определения новых режимов приема препарата, выявления новых побочных эффектов и т.д., что позволяет получить более подробную информацию о безопасности и эффективности препарата.

IV фаза исследований необходима для:

- усовершенствования схем дозирования препарата;
- исследования взаимодействия с другими лекарственными средствами;
- сравнительного анализа с другими стандартными препаратами;
- применения препарата в других возрастных группах или у пациентов других категорий;
- влияния отдаленных эффектов препарата на выживаемость (снижение или повышение уровня смертности);
- результатов длительного применения у пациентов различных групп.

*Основные и дополнительные исследуемые параметры, которые будут оцениваться в ходе исследования.*

В процессе подготовки клинического исследования устанавливаются основные и дополнительные (если необходимо) параметры исследования, в зависимости от цели исследования.

### **Исследование безопасности противотуберкулезных вакцин**

Исследование безопасности начинается с первой фазы клинического испытания.

Испытание безопасности вакцинного препарата представляет собой наблюдение за состоянием пациента и оценку последствий вакцинации в течение установленного периода времени согласно заранее составленному графику.

*Основные критерии включения:*

- взрослые добровольцы от 18 до 45 лет;
- здоровые (медицинская история, нормальные клинико-лабораторные показатели);
- отсутствие анамнестических данных о первичном и вторичном иммунодефицитных состояниях;
- отсутствие беременности, отрицательный тест на беременность в день вакцинации и отсутствие лактации;
- отсутствие активного или латентного туберкулеза;
- отрицательные тесты на ВИЧ-1 и ВИЧ-2, на поверхностный антиген гепатита В и на антитела к вирусу гепатита С;
- отсутствие сахара в моче и белка  $< 0,033$  г/л;
- отсутствие любых вакцинаций в течение 3 месяцев, предшествующих испытанию;

*Основные критерии не включения:*



- история активного туберкулеза;
- история аллергических реакции и анафилактического шока;
- известная аллергия к компонентам вакцины;
- история выраженной кожной реакции на туберкулиновый тест;
- наличие членов семьи с активным туберкулезом;
- системные нарушения, которые могут влиять на результат исследования;
- высокая температура в течение 7 дней, предшествующих вакцинации;
- любое злокачественное состояние;
- прием антибиотиков в течение 14 дней до вакцинации (перорально) и в течение 28 дней до вакцинации (парентерально);
  - лечение препаратами крови в течение 6 месяцев до исследования и в течение исследования;
  - алкогольная и наркологическая зависимость или история алкогольной и наркологической зависимости;
  - история астмы и хронических легочных заболеваний;
  - медицинские работники, контактирующие с группой риска (например, пульмонологи и бронхоскописты, работающие с больными туберкулезом);
  - профессиональный или регулярный контакт с сельскохозяйственными животными.

Критерии включения или исключения могут быть расширены или сужены в зависимости от специфики клинического испытания.

Параметры безопасности, которые должны оцениваться, схема и периоды регистрации зависят от конечной цели и особенностей клинического исследования.

После введения выбранным способом вакцинного препарата опытной группе и группе плацебо контрольным волонтерам полагается проводить активную проверку состояния пациентов по определенным дням после вакцинации (до 14 и более дней в случае с большинством вакцин), которая включает в себя медицинский осмотр, электрокардиограмму, ультразвуковое исследование печени, общие анализы мочи и крови, компьютерную томографию легких и другие.

Учитываются наличие, характер и выраженность локальных и системных реакций у разных групп субъектов и в зависимости от дозы вакцинации. Кроме того, непосредственно после вакцинации пациенты должны находиться под наблюдением медицинского персонала не менее 3 часов. Продолжительное отслеживание состояния после вакцинации должно осуществляться в течение не менее 30 дней в форме интервью по телефону или с помощью опросных листов, форма которых устанавливается при планировании клинических испытаний. Формы опросных листов должны включать пункт о непредвиденных специфических реакциях. В эти формы необходимо также записать и другие реакции, которые могут произойти в течение периода наблюдения. Необходимо отмечать всю информацию, касающуюся состояния места инъекции вакцины, а также места, куда лицам контрольной группы делалось одновременное введение препарата-плацебо. Как правило, оценка местной реакции при внутрикожном и подкожном способах введения вакцины подразумевает измерение диаметра эритемы и уплотнения, градацию болевой реакции (например, небольшая, умеренная или сильная) и наличие болезненности при надавливании. Также регистрации подлежат такие системные проявления, как лихорадочное состояние, повышение температуры тела, недомогание, головная боль, рвота, нарушения работы желудочно-кишечного тракта, реакции слизистых оболочек и т.п. При описании подобных реакций должны учитываться характер вакцины и возраст пациентов.

Примеры клинических испытаний безопасности разных противотуберкулезных вакцин размещены на сайте US National Institutes of Health (<http://clinicaltrials.gov>).

## Исследование эффективности противотуберкулезных вакцин

При определении эффективности вакцинации наиболее точной является эпидемиологическая оценка, однако для этого необходимо проводить специально организованные контролируемые испытания, что требует много времени и специально разработанной программы. В связи с этим для оценки качества противотуберкулезных прививок применяются методы иммуноанализа, которые оценивают иммуногенные свойства вакцин.

Иммуногенность можно характеризовать как индукцию иммунного ответа. Существуют два значения понятия эффективности – эффективность вакцины в клинических исследованиях (efficacy), то есть способность вакцины обеспечивать защиту и эффективность (effectiveness – результативность) в реальной жизни, то есть влияние вакцины на заболеваемость населения туберкулезом, которая оценивается в результате проспективных или ретроспективных эпидемиологических исследований. Новая вакцина должна обладать иммуногенностью и эффективностью.

В фазах I и II необходимо определить четкие иммунологические параметры, свидетельствующие об эффективности и результативности вакцины.

При отборе вакцин для исследования в первой фазе исследователи должны исходить из данных, полученных в доклинических исследованиях, причем данные, полученные на животных, должны показать большую эффективность новой вакцины, по сравнению с вакциной БЦЖ, повышенную безопасность, либо отсутствие перекрестных реакций.

Начальная стадия исследования на эффективность должна проводиться с участием здоровых добровольцев ВИЧ-отрицательных, с отрицательной туберкулиновой пробой. В последующих исследованиях можно включить более широкую группу людей, которые туберкулин-положительны без активного туберкулеза.

Дизайн первой фазы иммунологического исследования должен быть направлен на:

- размер выборки;
- методы и схемы введения;
- отслеживание иммунологических реакций в ответ на вакцину;
- контроль: для взрослых контрольная группа должна включать группу превакцинации и группу плацебо. Для детей – группы исследования включают группу, получающую тестируемую вакцину и группу, которой проводится стандартная вакцинация БЦЖ вакциной. Исследования у детей и новорожденных не должны включать группу плацебо:

- сравнения с иммуногенностью БЦЖ;
- рандомизация и двойной слепой метод.

Оценка иммунного ответа в первой фазе включает:

- иммунный ответ 1 типа (например, Th1/CTL (цитотоксические Т-лимфоциты);
- экспрессия Th1 маркеров, таких как ИФН- $\gamma$ , ИЛ-12R и /или Tbet;
- ИФН- $\gamma$ /перфорин/пролиферативный ответ CD8<sup>+</sup> CTL;
- иммунный ответ, способный ингибировать рост микобактерий.

Иммунологические исследования в фазе I направлены на изучение:

- антигена специфичного клеточного иммунитета;
- ответов на стимуляцию живыми микобактериями;
- специфических ответов на соответствующие очищенные антигены микобактерий;
- реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Специфический иммунный анализ включает антиген специфичный лимфопротеративный анализ и определение в сыворотке крови пациентов количества ИФН- $\gamma$  секретирующих мононуклеарных клеток периферической крови методом ELISpot и путем определения количества ИФН- $\gamma$  в супернатанте мононуклеарных периферических клеток крови методом ELISA и методом поточной цитометрии (с использованием коммерческих наборов реагентов согласно протоколам фирм-производителей).

Рекомендуется проводить оценку CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в крови, продуцирующих цитокины ФНО-альфа, интерферон-гамма и ИЛ-2 с использованием коммерческих наборов реагентов согласно протоколам фирм-производителей.

II фаза исследования противотуберкулезных вакцин на эффективность должна быть комплексной с участием большого числа испытуемых, которых необходимо будет наблюдать в течение длительного времени, а также проводить комплексное обследование с использованием общепринятых клинических и лабораторных методов.

Ниже приводятся методы исследования, применяемые для изучения эффективности противотуберкулезных вакцин в первой фазе:

*микробиологические:*

- выявление роста бактерий туберкулеза из внутрикожных изъязвляющихся ран (временные интервалы 7, 13, 15, 20-22, 27-29, 34-36, 41-43 дни и 2 месяца после вакцинации);

*иммунологические:*

- определение наличия поствакцинальных, специфических секреторных IgA с помощью ELISA (временные интервалы – непосредственно после вакцинации, через неделю, 2, 6 и 12 месяцев после первичной вакцинации и через неделю, 2, 6 и 12 месяцев после повторной вакцинации);

- определение секреции ИФН-γ в цельной крови методом ELISpot (временные интервалы – непосредственно после вакцинации, через неделю, 2, 6 и 12 месяцев после первичной вакцинации и через неделю, 2, 6 и 12 месяцев после повторной вакцинации);

- определение процента цитокинпродуцирующих Т-клеток (временные интервалы – на 0, 14, 28, 56, 84, 112, 140 и 182 дни);

- используя ПЦР в реальном времени, анализ экспрессии генов, связанных с иммунологическими реакциями, после стимуляции моноклеарных клеток периферической крови белками культуральных фильтратов (временные интервалы – 12 месяцев после вакцинации);

- лимфопролиферативный анализ цельной крови;

- исследование туберкулиновой пробы (временные интервалы – до вакцинации и через 12 месяцев после вакцинации).

Примеры клинических испытаний эффективности разных противотуберкулезных вакцин размещены на сайте US National Institutes of Health (<http://clinicaltrials.gov>).

### **Особенности клинических исследований безопасности и эффективности вакцины Имурона-Вак**

#### **Актуальность проблемы**

Рак мочевого пузыря (РМП) является одним из наиболее распространенных неопластических заболеваний человека и составляет по данным ВОЗ около 3% от всех злокачественных новообразований или 70% всех опухолей мочевого тракта. Ежегодно в мире регистрируется 170 000 новых случаев РМП. Среди онкоурологических заболеваний РМП занимает 2 место после рака предстательной железы.

Основным методом лечения РМП является оперативный. Однако, частота рецидивирования и возможность прогрессии при поверхностных опухолях мочевого пузыря, неудовлетворительные результаты цистэктомии при инвазивном раке заставили искать дополнительные терапевтические подходы.

Широкое распространение в последние годы получила иммунотерапия и иммунопрофилактика поверхностного РМП. Наиболее часто с этой целью используют вакцину БЦЖ, которая при внутрипузырном применении зарекомендовала себя как высокоэффективное средство.

В отделениях урологии ВОНЦ АМН СССР и НИИМР АМН СССР с 1988 года проводились клинические испытания отечественного препарата БЦЖ – Имурон-Вак для лечения и профилактики поверхностного РМП.

### **Клинические исследования безопасности вакцины Имурона-Вак**

Исследование местной и системной токсичности Имурон-Вак при внутрипузырном применении.

#### *Местная токсичность*

Местную токсичность оценивают при внутрипузырном введении вакцины БЦЖ по наличию:

- 1) дизурии:
  - умеренной – наблюдается после 2-4 инстилляций практически у всех пациентов и длится от нескольких часов до суток;
  - выраженной – наблюдается 42-48%, характеризуется частым (через 30-60 минут) болезненным мочеиспусканием, длится до 2-3 суток;
- 2) боли в области мочевого пузыря – обычно сопутствует дизурии, проявляется после 4-6 введений, встречается у 13-38%;
- 3) макрогематурии – наблюдается у 22-28%, длится от нескольких часов до 1-2 дней;
- 4) цистита – наблюдается у 22-34%, у части больных может сопровождаться макрогематурией и субфебрильной температурой.

#### *Системная токсичность*

Системную токсичность оценивают по наличию:

- 1) температуры – у большинства в день введения или на следующий день наблюдается температура 37,2-37,5 градусов. Как правило, температура повышается после 3-4 инстилляций. Значительное повышение температуры – более 38 градусов, может иметь место у 42,3-71,4% (в зависимости от схемы введения);
- 2) артралгии – появляются после 4-5 введений БЦЖ, наблюдаются у 5-15% (в зависимости от схемы введения);
- 3) гриппоподобного синдрома – наблюдается у 13-47% (в зависимости от схемы введения), развивается после 5-8 недель от начала инстилляций;
- 4) аллергической реакции (конъюнктивит и отечность) – проявляется у единичных пациентов;
- 5) сепсиса – наблюдается у тяжелых пациентов (3%).

### **Клинические исследования эффективности вакцины Имурона-Вак**

Исследования по оценке эффективности вакцины заключается в:

- 1) необходимости изучения лечения имураном поверхностных часто рецидивирующих опухолей мочевого пузыря путем внутрипузырного введения вакцины БЦЖ;
- 2) необходимости изучения иммунопрофилактики имураном рецидивов поверхностного рака мочевого пузыря после трансуретральной резекции (ТУР) и трансвезикальных электроэксцизий опухолей.

Контингент, участвующий в клинических исследованиях – пациенты:

- 1) больные с множественным поражением мочевого пузыря поверхностными рецидивирующими опухолями;
- 2) больные с первичными поверхностными опухолями мочевого пузыря, когда из-за множественности поражения невозможно выполнить ТУР, в том числе больные после неэффективной внутрипузырной химиотерапии.

### Критерии исключения

- 1) тяжелые интеркуррентные заболевания в стадии декомпенсации;
- 2) наличие в анамнезе перенесенного ранее туберкулеза;
- 3) сопутствующие заболевания аллергической природы;
- 4) наличие пузырно-мочеточникового рефлюкса;
- 5) аденома простаты II ст.;
- 6) уменьшенная емкость мочевого пузыря;
- 7) наличие второй опухоли.

Результаты внутрипузырного применения химиопрепаратов с лечебной и профилактической целью: тиотэфа, адриамицина, митомицина С, фарморубицина могут служить в качестве «исторического» контроля.

До начала клинического исследования необходимо:

- проводить тщательное клиническое, рентгенологическое, ультразвуковое, эндоскопическое обследование больных с целью установления стадии заболевания, количества, размеров и локализации опухолевых образований;
- проводить биопсию опухоли;
- цитологическое исследование мочи;
- изучить иммунологический статус больных;
- проводить внутрикожную пробу с 2 ТЕ очищенного туберкулина, результат которой оценивать через 72 часа;
- проводить бактериологическое исследование мочи с определением чувствительности микрофлоры к антибактериальным препаратам.

### *Схемы внутрипузырного применения вакцины БЦЖ у больных поверхностным раком мочевого пузыря*

Разовая доза	Режим введения	Поддерживающая терапия
100 мг	1 раз в неделю × 8 недель	100 мг 1 раз в 2 недели × 8 недель 100 мг 1 раз в месяц × 6 месяцев 100 мг 1 раз в 3 месяца до 2 лет
150 мг	1 раз в неделю × 6 недель	нет
120 мг	1 раз в неделю × 6 недель	100 мг 1 раз в 2 недели × 12 недель 100 мг 1 раз в месяц × 6 месяцев

Больным первой группы после опорожнения мочевого пузыря по эластичному катетеру вводят в мочевой пузырь 100 мг вакцины БЦЖ, растворенной в 50 мл физиологического раствора. Необходимо удерживать препарат в течение 2 часов. Через 2 часа пациенты самостоятельно должны опорожнять мочевой пузырь посредством мочеиспускания. Введение препарата производят 1 раз в неделю в течение 8 недель. Через 2 недели после окончания 8-недельного цикла необходимо проводить контрольное обследование, включающее цистоскопию и цитологическое исследование мочи. Больных с отсутствием эффекта, а также с частичным эффектом, но плохо переносящих терапию, переводят на другой вид лечения. Пациентам с частичным эффектом и хорошей переносимостью препарата проводят повторный 8-недельный цикл БЦЖ-терапии в той же дозе с последующей оценкой эффекта.

В тех случаях, когда имеется полная регрессия опухоли, проводят поддерживающую терапию: 100 мг вакцины БЦЖ вводят в мочевой пузырь 4 раза с интервалом в 2 недели, затем 6 раз с интервалом в 1 месяц, затем 4 раза с интервалом в 3 месяца. За 20 месяцев поддерживающего лечения доза вакцины БЦЖ составляет 1400 мг. Контрольные обследования необходимо проводить через каждые 3 месяца. В дальнейшем, при сохранении полной регрессии больной наблюдается без лечения.

Больным второй группы вводят 150 мг вакцины БЦЖ, растворенной в 50 миллилитрах физиологического раствора, в мочевой пузырь по катетеру еженедельно в течение 6 недель. Необходимо удерживать препарат в течение 2 часов. Контрольное обследование проводят через 1 месяц после окончания лечения. При полной регрессии опухоли больной должен наблюдаться.

Больным третьей группы вводят 120 мг вакцины БЦЖ, растворенной в 50 мл физиологического раствора, в мочевой пузырь по катетеру еженедельно в течение 6 недель. Необходимо удерживать препарат в течение 2 часов. Контрольное обследование необходимо проводить через 1 месяц после лечения. В последующем больного переводят на поддерживающую терапию: 6 инстилляций по 100 мг вакцины БЦЖ с интервалом в 2 недели и затем после очередного контрольного обследования – 6 инстилляций по 100 мг вакцины БЦЖ с интервалом в 1 месяц. Таким образом, суммарная доза препарата составляет 1920 мг. Затем при наличии полной регрессии больной должен наблюдаться без лечения.

Оценка иммунологических изменений при проведении внутрипузырной БЦЖ-терапии.

Необходимо изучить динамику иммунологического статуса до и после лечения. С этой целью определяют:

- 1) количество Т-лимфоцитов (Е-РОК);
- 2) состав Т популяции Т-лимфоцитов;
- 3) количество Тм (хелперы) и Ту (супрессоры и цитотоксические клетки);
- 4) уровень иммуноглобулинов класса G, A, M по Mancini в периферической крови;
- 5) реакцию бласттрансформации на фитогемагглютинин (ФГА);
- 6) реакцию гиперчувствительности замедленного типа на туберкулин, результаты которой оценивают по размеру папулы в миллиметрах (0-1 – отрицательная, 2-4 – сомнительная, 5-17 – положительная, 18 и более – резко положительная).

### Литература

1. Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» (от 12 апреля 2010 г. N 61-ФЗ).
2. Национальный Стандарт Российской Федерации – Надлежащая Клиническая Практика.
3. Программа иммунотерапии и иммунопрофилактики рака мочевого пузыря вакциной БЦЖ на 1989-1994.
4. Отчет о результатах внутрипузырного применения отечественного субштамма БЦЖ для лечения и профилактики поверхностного рака мочевого пузыря.
5. Фигурин К.М. Химиотерапия и иммунотерапия рака мочевого пузыря. Автореферат, М., 1993.
6. Матвеев Б.П., Фигурин К.М., Карякин О.Б. Рак мочевого пузыря, М., 2001.
7. Ann M. Ginsberg, A Proposed National Strategy for Tuberculosis Vaccine Development. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 39, Issue Supplement 3, Pp. S233-S242.
8. Ana M. Aguirre-Blanco, Pauline T. Lukey, Jacqueline M. Cliff, and Hazel M. Dockrell. Strain-Dependent Variation in Mycobacterium bovis BCG-Induced Human T-Cell Activation and Gamma Interferon Production In Vitro. *Infection and Immunity*, June 2007, p. 3197-3201, Vol. 75, No. 6.
9. Bo Wu, Chunhong Huang. *Infection and Immunity*, July 2007, p. 3658-3664, Vol. 75, No. 7.
10. Daniel F. Hoft, Robin M. Brown, Robert B. Belshe. Mucosal Bacille Calmette-Guérin Vaccination of Humans Inhibits Delayed-Type Hypersensitivity to Purified Protein Derivative but Induces Mycobacteria-Specific Interferon- $\gamma$  Responses. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 30, Issue Supplement 3, Pp. S 217-S222.
11. Hussey, G. D., Watkins, M. L. V., Goddard, E. A., Gottschalk, S., Hughes, E. J., Iloni, K., Kibel, M. A. and Ress, S. R. (2002), Neonatal mycobacterial specific cytotoxic T-lymphocyte and cytokine profiles in response to distinct BCG vaccination strategies. *Immunology*, 105:314–324. doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01366.x.
12. ICH Topic E 6 (R1), Guideline for Good Clinical Practice (CPMP/ICH/135/95), European Medicines Agency, July 2002.

13. J. Glassroth, Clinical Considerations in Designing Trials of Vaccines for Tuberculosis.
14. Clinical Infectious Diseases, Vol. 39, Issue Supplement 3, Pp. S233-S242.
15. Rose Ann Murray et al. Bacillus Calmette Guerin Vaccination of Human Newborns Induces a Specific, Functional CD8+ T Cell Response. The Journal of Immunology, 2006, 177: 5647-5651.
16. Tuberculosis Vaccine Regulatory Workshop, Bethesda, Maryland, December 9, 2003.
17. Virginia Davids et al. The Effect of Bacille Calmette-Guérin Vaccine Strain and Route of Administration on Induced Immune Responses in Vaccinated Infants.

## ГЛАВА 14

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ АЛЛЕРГЕНОВ

*СОСТАВИТЕЛЬ: к. м. н. С.Ф. Радунская, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития, России Центр экспертизы и контроля МИБП*

#### Введение

Препараты аллергенов являются медицинскими иммунобиологическими препаратами, получаемыми из материалов природного происхождения и содержащими антигены, вызывающие развитие аллергических реакций.

Аллергены предназначены для аллергенспецифической диагностики и аллергенспецифической иммунотерапии (АСИТ) различных форм аллергических заболеваний (бронхиальная астма, поллиноз, атопический дерматит, отек Квинке, крапивница и др.).

Целью клинических исследований аллергенов является оценка их безопасности и терапевтической эффективности.

На первом этапе исследований аллергенов (I фаза) изучается их безопасность и переносимость.

Следующие этапы клинических исследований (II-III фаза) – направлены, в основном, на изучение лечебной эффективности аллергенов. Эти исследования проводятся, как правило, с использованием методов: двойных, слепых, плацебоконтролируемых испытаний с формированием опытных и контрольных групп. Основными показателями оценки эффективности аллергенспецифической иммунотерапии являются:

- клинические проявления заболевания;
- изменение интенсивности (степени выраженности) кожных тестов;
- изменение уровня специфических IgE.

На начальном этапе изучения нового аллергена его испытывают на ограниченной группе добровольцев обоего пола в возрасте 18-50 лет. Изучение препарата на детях проводят в рамках отдельных программ после рассмотрения отчета о результатах испытания аллергена на взрослых 18-50 лет.

Для испытания аллергенов, предназначенных для аллергенспецифической иммунотерапии (АСИТ), отбирают группу больных атопическими или инфекционно-аллергическими заболеваниями, учитывая следующие основные критерии включения в испытания и критерии исключения:

- аллергологический анамнез;
- положительные кожные пробы на испытуемый аллерген;
- клиническая картина заболевания,
- противопоказания для проведения АСИТ.

При сомнительных результатах кожных тестов, нечетких данных анамнеза, наличие у добровольца сенсibilизации к испытуемому аллергену следует дополнительно проводить ему провокационный тест (назальный и конъюнктивальный).

Количество испытуемых в основных и контрольных группах определяется конкретно для каждого аллергена с учетом частоты сенсibilизации к тому или иному аллергену.

Оценку лечебной эффективности аллергенов проводят по клиническим показателям в соответствии с общепринятой 4-балльной системой:



- отличный эффект – отсутствие потребности в приеме медикаментов;
  - хороший эффект – наличие слабых симптомов, требующих эпизодического приема медикаментов;
  - удовлетворительный эффект – менее выраженные клинические симптомы
- уменьшенная потребность в противоаллергических препаратах,  $\beta_2$ -антагонистах;
- без эффекта – отсутствие изменений в клиническом состоянии больных и в потребности в противоаллергических препаратах и в  $\beta_2$ -антагонистах.

Для испытания аллергенов, предназначенных для специфической диагностики, должны быть сформированы две группы:

- больные атопическими или инфекционно-аллергическими заболеваниями, имеющими повышенную чувствительность к тестируемому аллергену по анамнестическим данным и клиническим проявлениям заболевания, а также и по предварительным результатам кожного тестирования – основная группа.
- практически здоровые или больные, в анамнезе которых нет указаний на связь заболевания с испытуемым аллергеном – контрольная группа.

Критериями для отбора контингентов, подлежащих испытанию (критерии включения в испытания, критерии исключения) являются: отсутствие противопоказаний, предусмотренных и изложенных в протоколе испытаний, данные аллергологического анамнеза; клиническая картина заболевания (тяжесть его); данные клинико-лабораторного, а при необходимости – бактериологического и других видов обследования.

Аллергенспецифическая диагностика проводится путем постановки кожных проб (накожные пробы – прик-тест/тест-укол, скарификации и внутрикожные пробы).

Параллельно с аллергеном проводят кожные пробы с тест-контрольной жидкостью и с 0,01% раствором гистамина. Местная реакция на аллерген возникает через 15-20 минут и сохраняется до 30-40 минут. Результаты кожных проб учитывают только в тех случаях, когда тест-контрольная жидкость дает отрицательную реакцию, а раствор гистамина – положительную кожную реакцию.

Диагностические аллергены считают специфически активными, если они вызывают положительные реакции у лиц основной группы и не вызывают положительные реакции у лиц контрольной группы.

Аллергенспецифическую диагностику проводят не ранее, чем через:

- 1 неделю после туберкулиновой пробы;
- 2 недели после применения инактивированных вакцин и терапии антигистаминными препаратами;
- 4 недели после применения живых вакцин;
- не менее 8 недель после применения вакцины БЦЖ.

Испытание диагностических и лечебных аллергенов должен проводить только врач-аллерголог. Для оценки безопасности испытуемых аллергенов осуществляется изучение местных и общих реакций на введение препаратов, для чего врач проводит осмотр и опрос больного, а также комплекс лабораторно-инструментальных обследований, включая следующие: измерение температуры, артериального давления, клинический анализ крови, общий анализ мочи, исследование функции внешнего дыхания. Результаты наблюдений за больными вносят в протокол изучения безопасности и специфической активности препарата и дневник специфической иммунотерапии.

Проведение специфической диагностики и специфической иммунотерапии должно осуществляться только в аллергологическом кабинете или аллергологическом отделении больницы, оснащенных препаратами противошоковой терапии, поскольку в ряде случаев у высокочувствительных лиц могут возникать общие реакции немедленного типа (крапивница, бронхоспазм, обострение основного заболевания, отек Квинке, анафилактический шок).

После проведения кожного тестирования и иммунотерапии пациент должен наблюдаться не менее 60 минут.

Аллерген считают безопасным, если при его введении больным с диагностической или лечебной целью у них не возникает общих и местных гиперергических реакций (гиперергической местной реакцией следует считать реакцию кожи на введение аллергена, размеры которой превышают максимальные, предусмотренные установленной схемой учета реакций).

Оценку лечебной эффективности аллергенов возможно проводить также и при использовании адекватных методов *in vitro*.

Эффект лечения обычно оценивают не ранее 6 месяцев после завершения курса терапии. В зависимости от характера аллергена сроки определения эффективности лечения могут быть различными. Так, в частности, при поллинозах эффективность аллерготерапии оценивается в период пыления растений. При этом в дневнике специфической иммунотерапии добровольцев ежедневно отмечаются интенсивность симптомов и суточная потребность в противоаллергических препаратах.

Результаты клинических исследований оформляются в виде отчета, который должен содержать материалы по результатам изучения безопасности и специфической активности аллергенов. Отчет должен содержать сведения об общем количестве лиц, получивших испытуемый препарат, распределение их по возрасту, полу, нозологическим формам заболеваний и другим показателям. В отчете должны быть представлены данные по частоте встречаемости побочных реакций, изменению качества жизни больных после проведения АСИТ, клиническая эффективность АСИТ.

Помимо текстового описания данный материал следует представить в виде таблиц. Текстовая часть должна содержать фактические материалы, а не общие положения.

В выводах должно быть сформулировано заключение о достаточности полученных материалов для решения вопроса о регистрации препарата, а также рекомендованы дозы препарата и схема его применения.

## ГЛАВА 15

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БАКТЕРИОФАГОВ

*СОСТАВИТЕЛИ: к. м. н. О.С. Дарбеева, к. м. н. Л.М. Майская, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравоохранения России, Центр экспертизы и контроля МИБП*

Лечебно-профилактические бактериофаги являются антибактериальными препаратами и используются для лечения и профилактики гнойно-септических и кишечных инфекций. При конструировании препаратов отбирают высоко вирулентные фаги – бактериальные вирусы природного происхождения, активные в отношении гомологичных видов бактерий, независимо от их устойчивости к антибиотикам. Широкое распространение бактериальных возбудителей, резистентных к широкому кругу антибиотиков, в том числе новых поколений, делает проблематичным адекватный выбор антимикробной терапии. Благодаря строгой специфичности действия, бактериофаги в отличие от антибиотиков, не угнетают нормальную микрофлору, не подавляют иммунной защиты, а также не вызывают аллергизации. Возможность преодоления первичной фагоустойчивости бактерий обеспечивает актуальность этой группы препаратов в отношении современных возбудителей гнойно-воспалительных инфекций. Поэтому лечебно-профилактические бактериофаги, как антибактериальные препараты специфической направленности, приобретают все большую актуальность для практического здравоохранения.

Поскольку фаговые препараты обладают строгой специфичностью действия, клинические испытания должны предусматривать только этиотропную антибактериальную терапию или профилактирование развития инфекций, обусловленных видами бактерий, соответствующими изучаемому препарату. В этой связи, клиническим наблюдениям обязательно предшествует работа по выявлению и сбору бактериальных возбудителей и определению их чувствительности к изучаемому фаговому препарату. На основании полученных результатов авторами может быть расширен диапазон действия препарата за счет его адаптации к устойчивым штаммам.

При организации клинических испытаний необходимо учитывать фагочувствительность штаммов, являющихся возбудителями инфекции, подлежащей лечению. При этом должна быть обеспечена полноценная материальная база для микробиологических исследований.

В настоящее время наибольшую социальную значимость приобрели гнойно-септические заболевания, связанные с пребыванием в стационарах. Все больше видов условно-патогенных бактерий становятся патогенными для ослабленных больных в госпитальных условиях. Для них характерны множественная устойчивость к антибиотикам и нарастание вирулентности. Поэтому выбор клинической базы должен основываться на анализе этиологической структуры бактериальных инфекций. Эпидемиологически значимые штаммы, изолированные от больных, из смывов с медицинского оборудования или с объектов больничной среды, подлежат изучению на чувствительность к исследуемому фаговому препарату. Госпитальные инфекции являются наиболее оптимальной моделью для клинических испытаний лечебно-профилактических бактериофагов. В связи с возможностью преодоления первичной фагоустойчивости выделенных возбудите-

лей, целесообразно адаптировать препарат к бактериальным штаммам, циркулирующим в данном стационаре.

Целью клинических исследований (КИ) новых лечебно-профилактических препаратов бактериофагов является изучение их эффективности при различных нозологических формах бактериальных инфекций, а также их безопасность и переносимость пациентами с инфекцией различной локализации и степени тяжести.

В этой связи подлежат решению следующие задачи:

1. Определение клинической эффективности фагового препарата.
2. Определение микробиологической эффективности фагового препарата.
3. Определение безопасности и переносимости фагового препарата пациентами с различными проявлениями инфекции соответствующей этиологии при различной локализации и степени тяжести.
4. Отработка наиболее оптимальных доз, рациональных схем и длительности применения нового фагового препарата при различных нозоформах и степени тяжести изучаемой инфекции.
5. Сопоставление клинической и микробиологической эффективности и переносимости фагового препарата с антимикробными препаратами, применяемыми при терапии различных нозологических форм данной инфекции.
6. Отработка показаний к назначению исследуемого препарата и рекомендаций по его использованию в медицинской практике.

В качестве групп сравнения должны вестись наблюдения за больными с аналогичными заболеваниями соответствующей этиологией, нозоформами и степенью тяжести, получающие традиционную антимикробную терапию.

### **Дизайн исследования (методология)**

Основанием для начала проведения клинических испытаний являются результаты отчета по доклиническому изучению нового фагового препарата, проведенные *in vitro* и на животных.

При планировании и составлении протокола КИ необходимы четкое описание методов выделения и идентификации возбудителей инфекции, оценка клинической значимости выделенных микроорганизмов, их количественная оценка с критериями интерпретации по результатам терапии, описание методов определения чувствительности бактерий к бактериофагам.

При планировании КИ нового фагового препарата необходимо предусмотреть следующее:

- основные (первичные) и второстепенные (вторичные) критерии клинической эффективности при каждой нозологической форме наблюдаемой инфекции;
- вид исследования (проспективное, двойное слепое, рандомизированное исследование в параллельных группах);
- рандомизация пациентов с указанием параметров, например, по тяжести, длительности заболевания, предшествующей антимикробной терапии;
- дозировка и режим введения, продолжительность курса;
- возможность сочетанного применения с базисной антибиотикотерапией, в первую очередь при выявлении нескольких видов бактериальных возбудителей (микстинфекция);
- условия отмены исследуемого препарата или прерывания клинических исследований.

### **Критерии включения пациентов в клинические исследования**

Лечебно-профилактические бактериофаги являются антибактериальными препаратами узко специфической направленности, подавляющими только целевых (гомологических) возбудителей. Обязательным условием проведения испытаний является фагочувствительность бактериальных штаммов, вызвавших развитие инфекции.

Поскольку антибактериальное действие бактериофагов в отличие от антибиотиков развивается постепенно, для испытания фаговых препаратов в виде монотерапии целесообразно включение больных с нетяжелыми проявлениями изучаемой инфекции. При определенных условиях (по клиническим показаниям) у части наблюдаемых возможно совместное назначение бактериофагов и антибиотиков (в качестве базисной антибиотикотерапии). При этом аналогичная базисная антибиотикотерапия должна проводиться в группе сравнения.

В клинические исследования включаются больные:

- а) у которых выявленный возбудитель чувствителен к изучаемому препарату;
- б) не получавшие антимикробные препараты по поводу данного заболевания или сопутствующих заболеваний;
- в) начавшие получать антимикробную терапию (не более одной дозы) до включения в исследование через 2-3 дня по прошествии (кроме антибиотиков с коротким курсом – менее 3 суток).

Критериями исключения для клинических исследований новых фаговых препаратов являются анамнестические данные о серьезных неблагоприятных лекарственных реакциях, в том числе какие-либо аллергические проявления, а также тяжелые сопутствующие соматические заболевания. Беременность и лактация не являются противопоказаниями, поскольку бактериофаги являются вирусами бактерий и по определению не обладают тропизмом к клеткам других организмов. Накопленный в течение длительного временного периода успешный опыт использования лечебно-профилактических бактериофагов при лечении гнойно-воспалительных заболеваний у беременных и кормящих (лактрующих) женщин свидетельствует о безвредности этих препаратов для данной категории пациентов.

### **Проведение клинических исследований**

Краткая характеристика различных фаз клинических испытаний нового фагового препарата:

**I фазу** клинических исследований проводят для определения реактогенности и безопасности нового лечебно-профилактического фагового препарата для человека, как правило на здоровых добровольцах, однако может быть получено разрешение на ограниченные исследования у пациентов с нетяжелыми проявлениями инфекции, вызванной бактериальным возбудителем, гомологичным фаговому препарату.

В ходе клинических испытаний I фазы должны контролироваться клинические и лабораторные данные для выявления неблагоприятных лекарственных реакций (НЛР). В число обследований, как правило, должны входить развернутый клинический анализ крови, клинический анализ мочи. Кроме того, необходима микробиологическая диагностика инфекционного заболевания с количественной характеристикой и определением фагочувствительности возбудителя, предвещающая назначение препарата. **Включение пациента в группу наблюдения возможно лишь при выявлении чувствительности бактериального штамма к изучаемому препарату.**

После завершения клинических испытаний I фазы и подтверждения безопасности нового фагового препарата следует продолжение клинических испытаний II-й фазы.

**II фазу** клинических исследований проводят в виде контролируемых наблюдений за больными с нетяжелыми проявлениями инфекции, вызванной бактериальным возбудителем, **гомологичным и чувствительным к изучаемому фаговому препарату.** При формировании групп следует учитывать, чтобы у пациентов не было серьезных сопутствующих заболеваний. Изучение эффективности препарата проводят в сопоставлении со стандартными антибактериальными препаратами для лечения данной инфекции. В качестве препаратов сравнения используют антибиотики.

В ходе проведения клинических испытаний II фазы отрабатываются дозировка и продолжительность курса в зависимости от нозологической формы или от степени тяжести. При этом должны контролироваться клинические и лабораторные данные, в том числе

развернутый клинический анализ крови, клинический анализ мочи. Кроме того, необходима микробиологическая диагностика инфекционного заболевания с количественной характеристикой и определением чувствительности возбудителя к исследуемому фаговому препарату и антибиотику. Эти исследования проводят перед началом и по окончании наблюдения.

Проводится анализ состояния пациентов в течение 3-4 недель после завершения курса фаготерапии и базисной антимикробной терапии в основной и контрольной группах для определения окончательного (отдаленного) клинического и микробиологического исхода лечения и выявления отдаленных нежелательных лекарственных реакций (НЛР). Следует обратить особое внимание на возможность формирования устойчивости возбудителей к антимикробным препаратам (в первую очередь антибиотиков, так как для фаговых препаратов это маловероятно).

**III фазу клинических исследований** проводят после успешно прошедших КИ II-й фазы, в виде расширенных контролируемых наблюдений, главной целью которых служит оценка эффективности и безопасности нового фагового препарата в условиях, максимально приближенных к клинической практике.

При этом наблюдению подлежат большие группы пациентов (от нескольких сот до тысяч). В протоколе необходимо указать, какие действия следует предпринять в случае неэффективности фаготерапии, а именно определенные диагностические исследования, коррекция антибактериальной терапии или раскрытия кода рандомизации, если это необходимо в сложившейся клинической ситуации.

**IV фазу клинических исследований** проводят после регистрации препарата. По своей организации они подобны КИ III-й фазы и проводятся для оценки клинической эффективности препарата или решения отдельных аспектов (например, фармакоэкономические преимущества определенных аспектов фаготерапии) на большой и разнородной популяции пациентов.

Все клинические исследования, в том числе КИ III-й, так и IV-й фазы, предполагают наблюдения за больными с различными проявлениями инфекции, вызванной бактериальным возбудителем, гомологичным и чувствительным к изучаемому фаговому препарату.

### **Критерии определения эффективности лечебно-профилактических бактериофагов**

При клинических испытаниях оценивается как лечебная, так и микробиологическая эффективность препарата, поэтому в протоколе необходимо подробно изложить принципы оценки результатов.

Лечебная эффективность предполагает три категории:

1. Эффективность – полное исчезновение всех субъективных и объективных клинических признаков заболевания; уменьшение клинических проявлений или отсутствие прогрессирования по данным объективных исследований.
2. Неэффективность – ухудшение состояния, нарастание всех субъективных и объективных клинических признаков заболевания, появление новых симптомов, летальный исход.
3. Невозможно оценить – выход из исследования по каким-либо причинам, в том числе летальный исход во время проведения исследований, не относящихся к данному заболеванию.

Обязательно используются показатели лабораторных исследований.

Определение микробиологической эффективности

Микробиологическая эффективность оценивается после завершения курса фаготерапии и через 3-4 недели после проведения курса лечения при последующем наблюдении за пациентом. Возможны следующие оценки результатов терапии:

1. Элиминация возбудителя – прекращение высева (выявления) возбудителя из очага первичной локализации инфекции.

2. Снижение уровня присутствия возбудителя в биологическом материале из очага первичной локализации инфекции. Значительное снижение – на 2-3 порядка и более свидетельствует о наличии микробиологической эффективности.

3. Смена возбудителя или суперинфекция.

4. Колонизация – обнаружение новых микроорганизмов, отличающихся от первоначального возбудителя, в местах первичной локализации инфекции или в других биотопах при отсутствии признаков активного инфекционного процесса.

При наличии микст-инфекции, вызванной двумя или несколькими бактериальными агентами, микробиологическая эффективность оценивают по каждому виду отдельно.

По остальным позициям («Оценка безопасности», «Нежелательные лекарственные реакции», «Методы анализа и представленных данных») анализ материала проводится согласно общим требованиям.

## ГЛАВА 16

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРОБИОТИКОВ

*СОСТАВИТЕЛИ: д. м. н. Р.П. Чуприна, к. б. н. Д.С. Давыдов, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, Центр экспертизы и контроля МИБП*

По современной классификации пробиотики – живые микроорганизмы, оказывающие при естественном способе введения благоприятное воздействие на поддержание и сохранение здоровья человека [1, 2]. Лечебно-профилактические биопрепараты-пробиотики производят на основе живых непатогенных представителей нормальной микрофлоры организма человека, обладающих антагонистическими свойствами против представителей патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, повышающих резистентность макроорганизма за счет продукции ферментов, витаминов, биологически активных веществ, которые улучшают деятельность пищеварительной, иммунной систем и обменных процессов. Предназначены для коррекции нарушенной нормальной микрофлоры у детей и взрослых при дисбактериозах (дисбиозах) открытых полостей, а также в качестве самостоятельного или вспомогательного препарата при лечении острых и хронических заболеваний ротовой полости, верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, вагины.

При конструировании моно и комплексных препаратов должны быть обоснованы подбор штаммов, количественного соотношения их в дозе, подтверждены стабильность выработки штаммами биологически активных веществ при использовании разработанной технологии изготовления биопрепарата; в доклинических исследованиях должны быть определены параметры безопасности, переносимости, лечебной эффективности и механизма лечебного действия.

**Целью клинических исследований новых моно- или комплексных биопрепаратов** является получение доказательства переносимости, безопасности и эффективности предлагаемых лекарственных средств, данных об ожидаемых побочных эффектах при применении препаратов, определение механизма лечебного действия нового лекарственного средства.

**Задачами клинического испытания** новых лекарственных средств является:

- изучение безопасности, переносимости, лечебной (профилактической) эффективности при различных формах дисбактериозов (дисбиозов) открытых полостей организма человека (ротовой полости, верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, вагины) в сравнении с коммерческим препаратом-пробиотиком аналогичного действия;
- изучение безопасности, переносимости, лечебной эффективности при назначении в качестве самостоятельного средства или в комплексном симптоматическом лечении различных нозологических форм острой или хронической бактериальной и/или вирусной инфекций;
- уточнение показаний к применению нового препарата, отработка оптимальной схемы лечебного (профилактического) действия препарата, пути введения, дозировки и длительности его применения;
- установление противопоказаний к его использованию в качестве лечебного действия;



- выявление возможного побочного действия препарата, выработка рекомендаций по их предупреждению и мер по их устранению;
- изучение механизма лечебного действия препарата;
- разработка проекта инструкции по применению нового лекарственного средства в соответствии с результатами его клинического исследования.

#### **Протокол клинических исследований**

При планировании проведения клинического исследования необходимо определить следующее:

- вид исследования (проспективное, пострегистрационное, двойное слепое, рандомизированное и т.д.);
- основные и второстепенные критерии включения пациентов;
- возраст пациентов (дети, подростки, взрослые);
- принцип рандомизации пациентов: по возрасту, клинике и тяжести заболевания, наличию сопутствующих заболеваний, предшествующей антимикробной (химио-) терапии и др.;
- выбор препарата-сравнения (при необходимости);
- условия отмены исследуемого препарата или прерывания клинических исследований.

**Определение показаний и отбор больных.** Исследования проводят на больных с определенной нозологической формой и степенью тяжести заболевания.

#### **Критерии включения в исследование:**

- наличие у больного заболевания, соответствующего программе исследования;
- необходимые по программе исследования возраст больных основной и контрольной групп.

#### **Критерии исключения из исследования:**

- обострение основного заболевания, в том числе требующее неотложного хирургического вмешательства;
- острый болевой синдром;
- наличие у больного заболеваний и патологических процессов, которые могли бы осложнить оценку полученных результатов исследования;
- перенесенный инфаркт миокарда менее 3 месяцев давности, выраженная гипертензия, тяжелый сахарный диабет и др.

**Исследование у взрослых.** Применение новых лекарственных средств у лиц с серьезными сопутствующими заболеваниями следует проводить только после проведения исследований на больных без тяжелой сопутствующей патологии и в стационарных условиях, при установлении на них лечебной эффективности и возможного побочного действия лекарственного средства.

**Исследования у детей.** Исследования нового ЛС у детей должны проводиться только после исследования его переносимости, безопасности и лечебного действия у взрослых.

**Формирование групп.** При выборе контингента больных главным условием является однородность группы (пол, возраст, нозология заболевания, дозы и схема применения и др). Испытание препарата проводят на двух-трех группах (30-50 пациентов в каждой группе) в зависимости от вида исследований: опытной группе, получающей испытуемый препарат, 1-й контрольной группе, получающей коммерческую серию близкого по назначению препарата-сравнения, 2-й контрольной группе, получающей традиционное лечение. Группы должны быть сопоставимы по возрасту и полу, по клинике и тяжести заболевания, сформированы методом случайной выборки. Единица выборки – один человек.

В протоколе исследований указывают дозы и схемы назначения испытуемых препаратов, определяют условия, при которых испытуемые препараты могут назначаться в виде самостоятельного средства лечения или на фоне назначаемого симптоматического

лечения. Указывают, в каких случаях осуществляют отмену приема препарата или изменения дозы и схемы его назначения.

Исследуемые препараты должны быть отконтролированы в независимом аттестованном лабораторном центре и зашифрованы (необходимые условия при первичных клинических испытаниях нового препарата).

Все пациенты должны быть осведомлены о целях и задачах исследования и дать согласие на участие в клинических испытаниях. До и в ходе клинических испытаний у пациентов исследуются клинические и лабораторные данные:

- клинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови;
- микробиологический анализ до и через несколько дней после окончания курса лечения (качественный и количественный состав микрофлоры);
- для исследования механизма действия препарата используют иммунологические методы исследования: определение класса иммуноглобулинов, цитокинов и др.

**Оценка эффективности исследуемых препаратов** проводится по следующим позициям:

- 1) оценке антибактериальных и пробиотических свойств препарата;
- 2) оценке влияния на иммунный статус больного.

Основными критериями эффективности для лечебного действия препарата являются следующие параметры:

- динамика клиники течения заболевания (длительность интоксикации, нарушения консистенции стула, восстановление аппетита, исчезновения рвоты, тошноты и др.). Критериями клинической эффективности являются полное или частичное исчезновение симптомов заболевания, длительность их (в сутках), длительность ремиссии;

- у детей младшего возраста оценивают также вес, тургор и цвет кожи;
- динамика лабораторных показателей крови, мочи, биохимических показателей крови. Результаты лабораторных исследований могут свидетельствовать о наличии или отсутствии побочного действия испытуемого препарата, об эффективности его лечебного действия;

- динамика микробиологического изменения количественного и качественного состава микрофлоры;

- результаты повторного микробиологического анализа количественного и качественного состава микрофлоры через 1-2 месяца после окончания лечения необходимы для подтверждения эффективности изучаемого препарата;

- результаты иммунологических методов исследования позволят уточнить механизм лечебного действия испытуемого препарата.

Критериями клинической эффективности являются результаты микробиологических анализов, свидетельствующие о:

- 1) частичной или полной элиминации патогенных и/или условно-патогенных микроорганизмов;
- 2) смене возбудителей или микс-инфекции;
- 3) улучшении количественного и качественного состава нормофлоры или ее полной нормализации;
- 4) длительности ремиссии или полном выздоровлении пациента.

#### **Клиническая оценка субъективных показателей**

Значимость субъективных показателей больных распределяется по так называемой системе шкал или балльной системе.

#### **Лабораторные методы исследования**

- гемограмма, общепринятые биохимических показателей крови, билирубин, СОЭ;
- общепринятые исследования биохимических показателей мочи;
- макро- и микроскопическое исследование каловых масс, их объем, наличие жира, крови или иных примесей;
- копрологическое исследование каловых масс;

- бактериологическое исследование каловых масс. Критериями клинической эффективности являются результаты микробиологических анализов, свидетельствующие о 1) частичной или полной элиминации патогенных и/или условно-патогенных микроорганизмов; 2) смене возбудителей или микс-инфекции; 3) улучшении количественного и качественного состава нормофлоры или ее полной нормализации; 4) длительности ремиссии;

- иммунологические исследования: уровень иммуноглобулинов класса IgA, IgM, IgG, IgE, цитокинов, завершенность реакции фагоцитоза и др.

#### **Оценка безопасности нового биопрепарата**

Все жалобы больного и признаки возможных побочных эффектов должны быть зарегистрированы в дневнике наблюдения.

#### **Категории нежелательных явлений (НЯ):**

**Нет связи** – НЯ можно объяснить имеющейся у пациента патологией или сопутствующей терапией.

**Возможная связь** – наблюдается некоторая временная связь между НЯ и приемом препарата. При этом НЯ не удается объяснить имеющейся у пациента патологией или сопутствующей терапией.

**Вероятная связь** – временная связь между НЯ и приемом препарата несомненна и НЯ нельзя объяснить имеющейся у пациента патологией или сопутствующей терапией.

**Определенная связь** – НЯ возникает после приема препарата, исчезает после отмены исследуемого препарата или снижается после изменения дозы и схемы назначения; повторно возникает после его назначения по прежней дозе и схеме применения.

Материалы результатов клинического испытания оформляются в соответствии с Протоколом испытаний с представлением полных фактических данных, оценкой полноты выполненных исследований и предложениями клиницистов по результатам испытания.

Таким образом, эффективность нового биопрепарата-пробиотика оценивается с учетом тяжести заболевания, наличия сопутствующих заболеваний и осложнений, переносимости, безопасности и лечебного действия препарата и доказывается статистически в сравнении с контрольной группой больных.

#### **Литература**

1. WHO Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 1-4 October, 2001.

2. WHO Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. April 30 and May 1, 2002.

## ГЛАВА 17

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

СОСТАВИТЕЛЬ: д. м. н., проф. Н.А. Михайлова, НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН

Иммунная система человека выполняет важную функцию по сохранению постоянства внутренней среды организма, осуществляемую путем распознавания и элиминации из организма чужеродных веществ антигенной природы как эндогенно возникающих (клетки, измененные вирусами, ксенобиотиками, злокачественные клетки и т.д.), так и экзогенно проникающих (прежде всего микробы). Эта функция иммунной системы осуществляется с помощью факторов врожденного и приобретенного (или адаптивного) иммунитета. К первым относятся нейтрофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, NK- и NKT-лимфоциты; ко вторым – Т и В-клетки, которые ответственны за клеточный и гуморальный ответ, соответственно. При нарушении количества и функциональной активности клеток иммунной системы развиваются те или иные иммунологические нарушения.

Современная патология характеризуется наличием двух взаимосвязанных и взаимобусловленных процессов, а именно: ростом хронических инфекционных заболеваний, вызываемых условно-патогенными или оппортунистическими микробами, и снижением иммунологической реактивности населения, наблюдаемым практически во всех развитых странах.

Очевидно, что справиться с ростом инфекционной заболеваемости с помощью одних только антибиотиков практически невозможно. Антибиотик подавляет размножение возбудителя заболевания, но конечная его элиминация из организма является результатом деятельности факторов иммунитета. Более того, длительное неконтролируемое применение антибиотиков снижает иммунологическую реактивность организма. Поэтому на фоне подавленной иммунореактивности эффективность действия антибиотиков, а также противогрибковых, противовирусных и других химиотерапевтических средств снижается.

В связи с этим в настоящее время резко возрос интерес врачей к препаратам, действующим на иммунную систему организма. Безусловно, важное место в группе иммуномодулирующих препаратов занимают иммуномодуляторы микробного происхождения.

К иммуномодуляторам бактериального происхождения первого поколения относятся Пироогенал и Продигиозан. Эти препараты довольно широко применялись в клинической практике для стимуляции противобактериального иммунитета, но из-за их высокой пирогенности и других побочных эффектов в настоящее время применяются редко. Препараты бронхо-мунал, Имудон, ИРС-19, Рибомунил относятся ко второму поколению иммуномодуляторов бактериального происхождения. Препараты содержат лизаты или рибосомы бактерий, относящихся в основном к возбудителям респираторных инфекций: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* и др. Они имеют две функции: специфическую (вакцинирующую) и неспецифическую (иммуностимулирующую) и успешно применяются и в настоящее время. К препаратам третьего поколения относятся полусинтетические препараты, например Ликопид.

При анализе фармакологического действия иммуномодуляторов необходимо учитывать особенность функционирования иммунной системы, которая «работает» по типу сообщающихся сосудов, т.е. наличие груза на одной «чаше» приводит в движение всю систему. В связи с этим, вне зависимости от исходной направленности, под влиянием иммуномодулятора в конечном счете в той или иной степени изменяется функциональная активность иммунной системы в целом. Иммуномодулятор может оказывать избирательное влияние на соответствующий компонент иммунитета, но конечный эффект его воздействия на иммунную систему всегда будет многогранным. Такие особенности функционирования иммунной системы делают практически невозможным существование иммуномодулятора с абсолютно селективным конечным влиянием на иммунитет. Это положение позволяет сформулировать следующий принцип:

любой иммуномодулятор, избирательно действующий на соответствующий компонент иммунитета (фагоцитоз, клеточный или гуморальный иммунитет), будет в той или иной степени оказывать воздействие и на все другие компоненты иммунной системы.

Учитывая это положение, тем не менее, можно выделить ведущие направления фармакологического действия иммуномодуляторов бактериального происхождения, главной мишенью в организме для которых являются клетки моноцитарно-макрофагального ряда. Под влиянием этих иммуномодуляторов происходит усиление функциональных свойств фагоцитов: повышаются фагоцитоз и внутриклеточный киллинг поглощенных бактерий, а также продукция провоспалительных цитокинов, необходимых для инициации гуморального и клеточного иммунитета. Следствием этого могут быть усиление продукции антител, активация образования антигенспецифических Т-хелперов и ЦТЛ. Иммуномодуляторы бактериального происхождения усиливает практически все функции клеток этой системы, а именно:

- поглощение и киллинг микроорганизмов за счет активации лизосомальных ферментов и образования активных форм кислорода;
- киллинг чужеродных клеток (опухолевых и вирусинфицированных);
- экспрессию HLA-DR-антигенов, следствием чего является усиление презентации антигенов клетками иммунной системы.
- синтез цитокинов (ИЛ-1, ФНО, колониестимулирующих факторов).

Кроме того, различные бактериальные антигены, входящие в состав иммуномодуляторов микробного происхождения, индуцируют выработку специфических иммуноглобулинов различных классов как сывороточных, так и секреторных.

Таким образом, помимо комплексного воздействия на иммунную систему посредством активации моноцитарного звена иммунитета, бактериальные иммуномодуляторы усиливают специфический иммунитет к антигенам, входящим в их состав, выступая, в данном случае, в качестве вакцины.

Для того чтобы тот или иной лекарственный препарат мог быть отнесен к группе иммуномодуляторов, должна быть доказана его способность изменять иммунологическую реактивность организма в зависимости от ее исходного состояния, т.е. способность повышать или понижать показатели иммунитета. Для этого исследуемый препарат должен пройти доклинические испытания, проведенные в соответствии с Методическими рекомендациями, утвержденными Фармакологическим государственным комитетом при Минздраве РФ от 10.12.1998. В результате этих испытаний должно быть доказано его иммуномодулирующее влияние на компоненты иммунной системы: фагоцитоз, систему комплемента, гуморальный и клеточный иммунитет, систему цитокинов. Далее исследуемый препарат должен пройти клинические испытания в соответствии с правилами GCP, в результате которых на основании двойного слепого рандомизированного исследования будут доказаны его клиническая и иммунологическая эффективность и безопасность. В конечном итоге препарат регистрируется ФГК МЗ СР России как иммуномодулятор и выдается разрешение на его широкое медицинское применение и промышленное производство.

Только тот препарат, который прошел доклинические и клинические испытания по описанным выше правилам, отвечает требованиям, предъявляемым к иммуномодулирующим препаратам.

### **Основные характеристики этапов клинического исследования иммуномодуляторов**

Количество пациентов и их состав определяется в соответствии с фазой клинического исследования, особенностями и областью применения самого иммуномодулятора, согласно общепринятым стандартам исследования (GCP).

**Фаза I.** Цель исследований I фазы — установить переносимость и дать предварительную оценку безопасности иммуномодулятора бактериального происхождения, а также определить предпочтительную форму и методы введения препарата и безопасный уровень дозирования. Несмотря на то, что препарат предназначен для людей с различными отклонениями состояния здоровья, переносимость изначально исследуется на группе здоровых добровольцев. В I фазе исследования бактериальных иммуномодуляторов целесообразно участие от 20 до 100 здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 60 лет, допускается участие женщин детородного возраста с дополнительным проведением теста на беременность. Исследования фазы I проводятся в специализированных учреждениях, где есть необходимое оборудование и специально обученный персонал.

**Фаза II.** Оценив предварительную безопасность исследуемого препарата у здоровых добровольцев в ходе исследований фазы I, компания-спонсор инициирует исследования фазы II на большей популяции (100–200 человек).

Исследования фазы II обычно проводятся на небольшой гомогенной популяции пациентов, отобранной по жестким критериям. Это четко регулируемые исследования, спланированные для определения уровня безопасности препарата, определения клинической эффективности на отобранных группах пациентов с соответствующим заболеванием или синдромом. Основной задачей этой фазы является определение оптимального уровня дозирования для проведения III фазы. В задачи исследования может входить определение чувствительности пациентов к различным дозам препарата в зависимости от характеристик группы пациентов, частоты приема, дозы и пр. Показанием для назначения иммуномодуляторов бактериального происхождения является, как правило, частая заболеваемость респираторными инфекциями, соответственно целесообразно проводить исследование второй фазы на группе часто болеющих острыми респираторными инфекциями (>5 раз в год). Для контроля используется группа (20-50 человек) с той же патологией, не получающий исследуемый препарат или получающий плацебо. Возможно, в дальнейшем, дифференцировать группу исследования на несколько подгрупп в зависимости от исходного состояния испытуемых добровольцев (тяжести основного заболевания, частоты ОРЗ, сопутствующей патологии и т.д.)

**Фаза III.** Клинические испытания III фазы представляют собой тщательно контролируемые исследования, спланированные для определения безопасности и эффективности исследуемого препарата в условиях, приближенных к тем, в которых оно будет использовано в случае его разрешения к медицинскому применению. Цель III фазы — определить краткосрочное и долгосрочное отношение безопасность/эффективность для иммуномодулятора бактериального происхождения, определить его общую и относительную терапевтическую ценность, специфические характеристики препарата, исследовать профиль и разновидности наиболее часто встречающихся побочных реакций.

Обычно исследования имеют сравнительный дизайн по отношению к существующей стандартной терапии (или плацебо при исследовании нового класса препаратов). В зависимости от задач конкретного исследования на этой фазе проводят контролируемые исследования с плацебо, референтным препаратом с доказанным аналогичным клиническим эффектом. Испытания могут быть как слепыми, так и открытыми. Как правило, это многоцентровые испытания с участием больших (и, по возможности, разнообразных) групп пациентов (в среднем 1000-2000 человек). Чаще всего клинические исследования этой фазы — двойные слепые контролируемые, рандомизированные, а условия исследо-

ваний максимально приближены к обычной реальной рутинной медицинской практике. Данные, полученные в клинических исследованиях III фазы, являются основой для создания инструкций по применению препарата и для решения об его регистрации.

**Фаза IV.** Четвертая фаза исследования проводится после того как исследуемый иммуномодулятор был зарегистрирован по определенным показаниям и становится доступен через розничную сеть. Это, так называемые, постмаркетинговые (post marketing trials) испытания, проводятся на очень большом количестве участников и используются для определения новых режимов приема препарата, выявления новых побочных эффектов и позволяют получить более подробную информацию о безопасности и эффективности препарата. В клинических испытаниях IV фазы изучают или уточняют эффективность и безопасность зарегистрированных препаратов в пределах показаний, в отношении которых разрешено медицинское применение. IV фаза исследований может быть использована для усовершенствования схем дозирования лекарственного препарата, различных сроков лечения лекарственным препаратом, взаимодействия с пищей или другими лекарственными средствами, сравнительного анализа с другими стандартными курсами лечения, применения препарата в других возрастных группах или у пациентов других категорий, влияния отдаленных эффектов препарата на выживаемость (снижение или повышение уровня смертности), результатов длительного применения у пациентов различных групп.

## **МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ**

### **Оценка безопасности (переносимости) иммуномодуляторов микробного происхождения**

Для оценки переносимости бактериальных иммуномодуляторов необходим тщательный мониторинг состояния здоровья добровольцев до лечения, в процессе назначения препарата и после завершения его приема. Согласно общепринятым протоколам исследования, мониторинг включает в себя: физикальное обследование, контроль показателей жизнедеятельности организма (температура тела, артериальное давление, ЧСС); серологическое исследование (гепатит В, С, ВИЧ), клинический анализ крови; биохимический анализ сыворотки крови (С-реактивный белок, щелочная фосфатаза, глюкоза, креатинин, калий, натрий, кальций, общий билирубин, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), общий белок); общий анализ мочи и тест мочи на беременность у женщин репродуктивного возраста согласно общепринятым протоколам исследования.

В течение всего времени приема препарата необходимо активное наблюдение за добровольцами для оценки выраженности местных и системных реакций (в том числе, функциональных изменений со стороны органов и систем) и оказания своевременной и адекватной медицинской помощи. Целесообразно проведение регулярного амбулаторного наблюдения с мониторингом показателей жизнедеятельности организма и регистрации любых нежелательных явлений.

### **Оценка клинической переносимости**

Клиническую переносимость оценивают с момента введения ИМБП волонтеру по данным физикального обследования и при наличии/отсутствии системных реакций (повышение температуры тела, кашель, насморк, фарингит, увеличение лимфатических узлов, повышенная утомляемость, головная боль, головокружение, артралгии, миалгии, боль в животе, диарея и др.). При парантеральном способе введения ИМБП (инъекции, капли в нос, аэрозоли) дополнительно отмечают наличие/отсутствие местные реакции (боль, гиперемия, припухлость в месте инъекции; отек слизистой оболочки носа или ротовой полости).

Выраженность симптомов системных и местных реакций оценивают по 3-балльной шкале, где:

0 – симптомы отсутствуют;

1 – слабовыраженные симптомы;

2 – симптомы, заметно нарушающие нормальную ежедневную деятельность;

3 – симптомы, препятствующие нормальной ежедневной деятельности.

При появлении каких-либо нежелательных явлений во время исследования целесообразно дополнительно провести общий, клинический анализ крови, общий анализ мочи и исследование иммунного статуса для более глубокой оценки переносимости исследуемых бактериальных иммуномодуляторов.

### **Исследование иммунологической эффективности иммуномодуляторов микробного происхождения**

Безусловно, влияние иммуномодулирующего препарата на различные звенья иммунной системы человека является основополагающим для изучения его эффективности. Для этой цели необходимо регулярное всестороннее изучение иммунного статуса пациента (до приема препарата, при завершении приема препарата и спустя 6-12 месяцев после окончания приема). Исследование иммунного статуса производится согласно методикам, применяемым и зарегистрированным в Российской Федерации.

#### **1. Исследование врожденного иммунитета.**

##### **1.1 Оценка клеточного звена иммунитета.**

Для оценки клеточного звена иммунитета необходимо провести в указанные выше сроки определение субпопуляций Т-лимфоцитов ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , отношение  $CD4^+/CD8^+$ ).

##### **1.2 Оценка динамики цитокинового статуса.**

Важным является изучение влияния бактериальных иммуномодуляторов на выработку цитокинов, определяющих функциональную активность центральных иммунорегуляторных клеток (ИЛ-2, 4, 6, 16, 10, 12, ФНО) и определение интерферонов статуса добровольцев (определение интерферонов  $\beta$  и  $\gamma$ ).

##### **1.3 Исследование показателей фагоцитоза.**

Наиболее значимым показателем активности иммуномодулирующих препаратов является оценка их влияния на фагоцитоз, как ключевое звено функционирования иммунной системы сопряженное как с процессом передачи информации (процессинг и презентация) об антигене, так и непосредственно с реализацией лейкоцитами защитных функций (по обнаружению, поглощению и деструкции чужеродного агента, собственных поврежденных или погибших клеток). С этой целью необходимо определение количества фагоцитов, пролиферативной активности фагоцитов, фагоцитарный индекс.

1.4 Естественные киллеры (NK) представляют собой большие гранулярные лимфоциты с фенотипом  $CD3^+CD16^+CD56^+$ . Они играют важную роль в защите организма от различных внутриклеточных микроорганизмов и опухолевых клеток. В этой связи, исследование функциональной активности естественных киллеров представляется целесообразным.

#### **2. Исследование приобретенного иммунитета.**

Основным показателем приобретенного иммунитета является гуморальный иммунитет для оценки которого можно исследовать нижеизложенные показатели:

2.1 Исследование в динамике субпопуляции В лимфоцитов ( $CD19$ ) и уровни сывороточных IgA, M, G на фоне приема иммуномодулятора бактериального происхождения;

2.1 Важной частью противобактериальной защиты является местный иммунитет для оценки которого необходимо изучение динамики уровней секреторных IgA, M, G в процессе приема бактериального иммуномодулятора.

2.2 Исследование уровня общего IgE, кроме того, способствует косвенной оценке аллергенной активности иммуномодулятора. С этой же целью возможно, также определение специфического IgE к компонентам, входящим в состав препарата.

2.3 Для более полного исследования гуморального ответа на введение бактериального иммуномодулятора возможно определение динамики уровня антител к антигенам условно-патогенных микроорганизмов, входящим в состав препарата и для оценки перекрестных реакций с антигенами, не входящих в его состав.



2.4 Определение аутоантител к антигенам органов и тканей человека. Обычно исследуется уровень перекрестно-реагирующих АТ к антигенам органов и тканей человека после иммунизации исследуемым препаратом, что важно для оценки влияния исследуемого препарата на аутоиммунные процессы.

#### **Оценка клинического эффекта иммуномодуляторов микробного происхождения**

Наиболее важным для исследования иммуномодуляторов микробного происхождения является динамика собственно клинических проявлений заболевания или симптома, по поводу которого пациент получает исследуемый препарат. Для оценки клинического эффекта бактериальных иммуномодуляторов у пациентов на протяжении всего периода исследования должна проводиться регистрация частоты острых респираторных инфекций, их тяжести и связанной с ними необходимостью приема антибактериальных, симптоматических и других препаратов. Важно оценить также течение основного заболевания, длительность ремиссии, потребность в базисной терапии. Кроме того, с учетом конкретной патологии, у добровольцев проводятся дополнительные лабораторные и инструментальные исследования (посев мокроты, ФВД, УЗИ органов брюшной полости и др.).

## ГЛАВА 18

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

*СОСТАВИТЕЛИ: к. б. н. Л.К. Лаптева, к. м. н. Э.Ю. Кудашева, к. м. н. О.Г. Корнилова,  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, Центр экспертизы и контроля МИБП*

Иммуноглобулины человека (ИГ) – лекарственные средства, содержащие антитела против возбудителей различных бактериальных и вирусных инфекций и/или их токсинов.

Иммуноглобулины человека представляют собой концентрированные растворы или лиофилизаты иммунологически активных белковых фракций, выделенные из плазмы крови здоровых доноров методом фракционирования этиловым спиртом при температуре ниже 0 °С с дополнительными стадиями вирусинактивации.

Иммуноглобулины человека подразделяют на нормальные, предназначенные для профилактики и/или лечения вирусных и бактериальных инфекций, а также для заместительной терапии при агаммо- и гипогаммаглобулинемии, и специфические – для профилактики и/или лечения определенной инфекции. Иммуноглобулины выпускают как для внутривенного, так и для внутримышечного введения и содержат, в основном IgG.

Иммуноглобулины нормальные выпускаются для внутримышечного введения и применяются в основном для профилактики гепатита А, кори, коклюша, менингококковой инфекции, полиомиелита.

В лечебной практике широкое применение получил иммуноглобулин нормальный для внутривенного введения, который используется при лечении септицемии, сепсиса новорожденных, первичных иммунодефицитов, аутоиммунной гемолитической анемии, полиомиозита, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры и других заболеваний. Кроме того, иммуноглобулин нормальный для внутривенного введения применяется с целью профилактики гепатита А, кори, ветряной оспы.

В настоящее время в практике здравоохранения применяется большая группа специфических иммуноглобулинов:

- антирабический иммуноглобулин вводится с целью профилактики и лечения бешенства;
- противостолбнячный иммуноглобулин – для экстренной профилактики столбняка при повреждении кожных покровов, а также с целью лечения столбняка;
- противостафилакокковый иммуноглобулин применяется для лечения генерализованной стафилакокковой инфекции;
- иммуноглобулин против клещевого энцефалита вводится с целью профилактики данного заболевания в природных очагах инфекции, а также после укуса клеща; кроме того, применяется с лечебной целью при стертой, менингеальной и очаговой формах;
- иммуноглобулин против цитомегаловирусной инфекции используется как для профилактики, так и для лечения этого заболевания;
- иммуноглобулин против гепатита В, как правило, применяется новорожденным, родившимся от матерей – носителей HBsAg.

Исходя из показаний к применению иммуноглобулинов, разрабатываются Протоколы клинических исследований, определяются цели и задачи, а также методика исследований и показатели оценки эффективности.

При клинических испытаниях иммуноглобулинов, предназначенных для профилактики различных инфекционных заболеваний, особое внимание следует уделять профилактической эффективности препаратов, при этом сравнивая заболеваемость в группе добро-

вольцев, получивших иммуноглобулины, и не получавших данный препарат. Показатели профилактической эффективности являются наиболее информативным методом выбора оптимальных дозировок и схем применения иммуноглобулинов. Целесообразно использовать иммунологические методы исследования с целью определения уровня содержания специфических антител, а также длительности их циркуляции в организме человека.

Непременным условием клинического изучения новых препаратов иммуноглобулина человека является изучение их фармакокинетических характеристик, безопасности и эффективности, а при наличии на фармацевтическом рынке аналогичных коммерческих препаратов должно проводиться их сравнительное изучение.

Опыт применения препаратов нормального иммуноглобулина человека в клинической практике, качественные постмаркетинговые исследования позволяют прогнозировать эффективность и безопасность применения новых аналогичных лекарственных средств в ходе клинического исследования.

Клинические исследования должны проводиться в отношении препаратов с хорошо изученными в ходе доклинического изучения физико-химическими и иммунохимическими характеристиками. Безопасность применения препаратов иммуноглобулина должна быть подтверждена результатами изучения соответствующих биологических характеристик (молекулярные параметры, содержанием иммуноглобулинов классов А, М, G); для препаратов внутривенного введения особое значение приобретает контроль антикомплементарной активности, антигемагглютининов, содержания активатора прекалликреина. Для изучения фармакодинамики и терапевтической активности иммуноглобулинов человека необходим контроль содержания в препарате субклассов иммуноглобулина G, функциональной активности фрагментов иммуноглобулина G (Fab и Fc), а также содержание и нейтрализующая активность в отношении соответствующих инфекционных агентов противовирусных и антибактериальных антител.

### **Показания к применению иммуноглобулинов**

При выборе показаний для применения и обоснования параметров определения эффективности новых препаратов нормального иммуноглобулина человека для внутривенного введения необходимо учитывать:

- результаты проведения фармакокинетических исследований препаратов иммуноглобулина;
- общие минимальные концентрации иммуноглобулина в плазме крови пациентов, полученные при введении нового препарата, степень их сопоставимости с уровнями, полученными при введении ранее применяемого препарата;
- эффективность и безопасность нового препарата при первичном иммунодефиците и идиопатической тромбоцитопенической пурпуре.

С целью обоснованного подхода к введению иммуноглобулина необходимо проведение фармакокинетических исследований препаратов, которые должны проводиться как у здоровых добровольцев, так и у пациентов с первичным иммунодефицитом и таким заболеванием, как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура. Содержание иммуноглобулинов класса G должно определяться после 5-6 инфузий нового препарата в течение не менее 6 месяцев терапии, когда есть уверенность в том, что применявшийся ранее для лечения пациента коммерческий препарат отсутствует в организме добровольца.

Одним из критериев оценки фармакокинетических свойств иммуноглобулина человека является его способность поддерживать оптимальный уровень иммуноглобулина G (400-600 мг/дл) в организме пациента.

Дополнительными фармакокинетическими параметрами могут быть содержание подклассов иммуноглобулина G, содержание антител, например, против вируса гепатита В, противостолбнячных и др. Измерения должны проводиться через 7, 14 и 21 дней после инфузии исследуемого препарата.

В исследования должны быть включены не менее 40 добровольцев с синдромом первичного иммунодефицита, из которых 20 – дети в соответствующих возрастных группах.

В ходе таких исследований целесообразно проведение анализа популяционной фармакокинетики у пациентов с первичным иммунодефицитом и пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой, который позволяет выявить свойства конкретного препарата, влияющие на дозирование и частоту введения у пациентов.

Параметрами эффективности внутривенного применения препаратов нормального иммуноглобулина человека у пациентов с первичным иммунодефицитом являются:

- частота бактериальных инфекционных заболеваний;
- частота и длительность применения антибиотиков;
- количество и длительность госпитализаций.

### **Оценка безопасности иммуноглобулинов**

Применение препаратов нормального иммуноглобулина человека должно оцениваться по следующим параметрам:

- возникновению нежелательных явлений в течение 24 часов и последующих трех суток после инфузии;
- изменению артериального давления, частоты сердечных сокращений и дыхательных движений, температуры тела после введения препарата;
- значениям показателей клинического и биохимического анализа крови, общего анализа крови и мочи.

Особое внимание должно уделяться больным, страдающим идиопатической тромбоцитопенической пурпурой. Препараты нормального иммуноглобулина данным пациентам применяют в случае высокого риска кровотечений или перед оперативным вмешательством. В клинические исследования должны быть включены не менее 30 добровольцев с хронической идиопатической тромбоцитопенической пурпурой. Критерием включения добровольцев в исследование является уровень тромбоцитов в крови около  $20 \cdot 10^9$  кл/л. В ходе клинического исследования препаратов нормального иммуноглобулина для внутривенного применения у добровольцев с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой возможно применение кортикостероидных препаратов в случае, если уровень тромбоцитов в крови падает ниже  $20 \cdot 10^9$  кл/л на фоне иммуноглобулинотерапии. При прогрессирующем снижении содержания тромбоцитов в крови этих добровольцев, приводящем к необходимости повышения доз кортикостероидов, должен рассматриваться вопрос об исключении таких пациентов из исследования. Превентивное применение кортикостероидных препаратов у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой, включенных в клиническое исследование препаратов нормального иммуноглобулина для внутривенного применения, недопустимо.

**Показателями лечебной эффективности** внутривенного применения препаратов нормального иммуноглобулина человека у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой являются:

- доля пациентов, у которых в результате иммуноглобулинотерапии число тромбоцитов увеличилось до  $50 \cdot 10^9$  кл/л и более и сохранялось в течение 15 суток после инфузии при условии отсутствия поддерживающей терапии другими лекарственными средствами;
- доля пациентов, у которых в результате иммуноглобулинотерапии число тромбоцитов достигло физиологической нормы;
- степень увеличения числа тромбоцитов;
- длительность ответа на иммуноглобулинотерапию, рассчитываемую как длительность периода поддержания содержания тромбоцитов в крови на уровне не менее  $50 \cdot 10^9$  кл/л, либо длительность периода снижения содержания тромбоцитов в крови от  $50 \cdot 10^9$  кл/л до не менее  $20 \cdot 10^9$  кл/л;
- период достижения содержания тромбоцитов в крови до  $50 \cdot 10^9$  кл/л;
- максимальный уровень повышения содержания тромбоцитов в крови;
- регрессия геморагий.

В клинических исследованиях препаратов нормального иммуноглобулина при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре должны использоваться стандартные дозы иммуноглобулина: 0,8–1,0 г/кг в первый день терапии с возможным однократным повторным введением или 0,4 г/кг/сутки в течение 2–5 дней.

## ГЛАВА 19

### ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕПАРАТОВ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

*СОСТАВИТЕЛЬ: к. б. н. А.Л. Берковский, ФГБУ Гематологический научный центр  
Минздравоохранения России*

#### Введение

Гемофилия – это врожденное заболевание, которое наследуется по рецессивному признаку, сцепленному с полом. Заболевание передается через женщин детям мужского пола. Страдают гемофилией только мальчики, унаследовавшие от матери патологически измененную X-хромосому. Повышенная кровоточивость при гемофилии обусловлена нарушением процесса тромбопластинообразования во внутренней системе свертывания крови, что связано с дефицитом антигемофильного глобулина А (фактор VIII), либо антигемофильного глобулина В (фактор IX). Наиболее распространенный тип – это гемофилия А. Она примерно в 4 раза встречается чаще, чем гемофилия В. Клиническая картина при обоих типах схожа и проявляется в виде спонтанных и обильных посттравматических кровотечений, которые при несвоевременном и неправильном лечении могут привести к летальному исходу. Основным методом лечения гемофилии является заместительная терапия концентрированными препаратами дефицитных факторов свертывания крови – при гемофилии А фактора VIII и при гемофилии фактора IX. При адекватном подборе дозы и препарата больные могут сохранять трудоспособность и вести активный образ жизни. До конца 80-х годов такие препараты получали из плазмы крови человека. Однако, несмотря на современные методы вирусной инактивации, сохраняется риск передачи вирусных болезней. Быстрое развитие рекомбинантных технологий привело к появлению новых рекомбинантных вирус-безопасных препаратов. Терапия больным подбирается по индивидуальной чувствительности к препаратам.

Одним из самых грозных осложнений гемофилии является развитие антител к вводимому дефицитному фактору так называемого ингибитора. Ингибиторы развиваются от 10 до 35% при гемофилии А и в 3–5% при гемофилии В. Вводимый больному недостающий фактор свертывания быстро инактивируется ингибитором и стимулирует синтез новых антител – повышается титр и активность ингибитора. Кровотечение приобретает неконтролируемый характер, что может привести к трагическим последствиям. По данным мировой литературы риск развития ингибитора значительно выше при использовании рекомбинантных препаратов факторов свертывания. При ингибиторной форме гемофилии применяют препараты, обладающие шунтирующими механизмами действия.

Наиболее распространенным геморрагическим диатезом является болезнь Виллебранда, которой страдают как мужчины, так и женщины. Выделяют 3 типа болезни, в зависимости от которых больным проводится то или иное лечение. Большинство пациентов имеют легкое течение заболевания, которым лишь при травмах и хирургических вмешательствах требуется специфическое лечение. Однако от 20 до 30% больным болезнью Виллебранда требуется заместительная терапия дефицитным фактором.

Помимо выше перечисленных существует еще множество коагулопатий, которые встречаются значительно реже. Несмотря на разнообразность коагулопатий, при клини-

ческих исследованиях препаратов для их лечения можно руководствоваться одними и теми же принципами.

**Безопасность.** Важной задачей клинических исследований препаратов факторов свертывания крови является оценка безопасности их применения у пациентов.

**Нежелательные явления.** Для оценки безопасности исследуемого препарата учитываются все нежелательные явления (НЯ), имеющие причинно-следственную связь с его применением.

Для оценки НЯ используется шкала ВОЗ с указанием видов причинно-следственной связи. Оценка выраженности причинно-следственной связи НЯ с применяемым препаратом может проводиться по Шкале Наранжо или с помощью алгоритма Karch F.E., Lasagna L.

**Вирусная безопасность.** Несмотря на современные этапы вирусной инаktivации препаратов крови: отбор доноров, скрининг индивидуальной донации и пула плазмы, несколько ступеней вирусной инаktivации при производстве, при исследовании плазматических препаратов необходимо оценивать его вирусную безопасность. Для этого до и после применения исследуемого препарата пациентам определяют:

- тест на HBsAg;
- наличие антител к гепатиту С;
- анти-HIV тесты 1 и 2.

Учитывая белковую структуру факторов свертывания, важным фактором является оценка их иммуногенных и алергизирующих свойств.

**Иммуногенность.** С этой целью определяется наличие антител, связывающих и ингибирующих действие факторов VIII или IX в плазме крови. Анализы всех образцов проводятся в лаборатории методом Неймеген-пробы (разновидности пробы Бетезда). Снижение на 50% активности фактора VIII или IX в эталонной плазме будет соответствовать активности ингибитора, равной 1 Бетезда единице (БЕ).

**Аллергические реакции.** Для исследования алергизирующих свойств, преимущественно у пациентов возможно определение:

- антител к белкам, экспрессируемым в клетках яичников китайского хомяка, и рекомбинантному фурину (для рекомбинантных препаратов);

В случае развития алергических реакций на введение препарата, возможно исследование:

- уровня специфических иммуноглобулинов Е и М, вырабатываемых на исследуемый препарат, методом твердофазного иммуноферментного анализа;
- уровня циркулирующих иммунных комплексов.

**Тромботические осложнения.** Риск развития тромбозов значительно выше при применении концентратов фактора IX, чем при концентратах фактора VIII. У препаратов фактора IX с высокой степенью очистки значительно снижается риск тромбозов.

Для оценки возможного риска развития тромбоэмболических осложнений может проводиться определение:

- комплексов тромбин-антитромбин III;
- D-димеров;
- фрагмента протромбина 1, 2.

При проведении фармакокинетического исследования I фазы определение одного или нескольких данных параметров проводится по часам в установленные периоды забора крови.

**Токсичность препарата.** Для оценки токсических свойств, которые, как правило, не выражены при клинических исследованиях препаратов факторов свертывания крови, необходимы:

- общий анализ крови;
- биохимический анализ крови;
- общий анализ мочи;

- ЭКГ;
- физикальное обследование с оценкой показателей жизненно важных функций (АД, ЧСС, ЧДД, температуры тела).

**Переносимость.** Оценивается по однократному применению разных доз препарата фактора свертывания крови в нескольких группах пациентов. При этом исследуемый препарат вводится с нарастанием дозировки в каждой новой группе для выявления лимитирующей дозы токсичности или максимально переносимой дозы.

Если ни у одного из пациентов первой группы не разовьется связанных с исследуемым препаратом нежелательных явлений III и выше степени тяжести по шкале СТСАЕ 4.03, то группа закрывается и осуществляется набор в следующую группу. Если у одного из пациентов в группе разовьется нежелательное явление III и выше степени тяжести по шкале СТСАЕ 4.03, то в эту группу набирается дополнительно 3 пациента. Если нежелательные явления указанной степени тяжести разовьются у 2 и более пациентов данной увеличенной группы, то дальнейшее повышение дозы не производится, а дополнительные 3 пациента включаются в группу с предыдущей дозой. Если только у 1 пациента из увеличенной группы разовьется нежелательное явление III и выше степени тяжести по шкале СТСАЕ 4.03, то группа закрывается и осуществляется набор в следующую группу и т.д. Такая схема применяется до определения лимитирующей дозы токсичности или использования всех предусмотренных протоколом доз исследуемого препарата. Когда ограничивающая дозу токсичность будет определена в одной из групп, предыдущая нежесткая доза будет объявлена максимально переносимой.

**Эффективность.** Оценка эффективности складывается из оценки профилактической эффективности – при регулярном использовании препарата для профилактики спонтанных кровотечений, а также терапевтической эффективности при его использовании по требованию для купирования уже развившихся кровотечений.

К критериям эффективности относятся:

1. Частота случаев возникших кровотечений за исследуемый период (например, 6 месяцев) профилактического применения препарата.
2. Степень тяжести возникших кровотечений за исследуемый период (например, 6 месяцев) профилактического применения препарата.
3. Количество инъекций и суммарная доза препарата для купирования одного эпизода кровотечения.
4. Степень выраженности болевого синдрома по визуальной аналоговой шкале (ВАШ).
5. Повышение уровня качества жизни пациента.
6. Динамика показателей коагулограммы:
  - активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) является индикатором, прежде всего, внутреннего пути свертывания крови и определяется активацией FX, FV, протромбина, а также кининогена, прекалликреина, FXII, FIX, FVIII.
  - протромбиновое время.
  - процентное содержание дефицитного фактора свертывания.
  - титр ингибитора.
7. Изменение результатов Тромбоэластограммы (ТЭГ) – тест, позволяющий интегрально оценить информацию о всем процессе свертывания, включая инициацию, скорость образования сгустка и плотность сгустка. При ТЭГ *in vivo* создаются условия, напоминающие свертывание в организме. Имеется множество работ, свидетельствующих, что ТЭГ может быть использована у больных ингибиторной формой гемофилии для мониторинга гемостатического действия рекомбинантного фактора VIIa как *ex vivo*, так и в клинических условиях при кровотечениях.
8. Теста генерации тромбина. С помощью этого теста можно измерить концентрацию тромбина в плазме до и после образования сгустка. Этот тест является чувствительным

к изменениям, происходящим в факторах свертывания крови. В плазме крови больных гемофилией А, в отсутствии ФVIII скорость реакций, ведущих к образованию тромбина и последующему формированию сгустка, резко снижена. Этот тест используют для мониторинга дозы шунтирующих препаратов у больных ингибиторной формой гемофилии. Отмечена корреляция между клиническим ответом на введения шунтирующих препаратов и величиной эндогенного тромбинового потенциала.

К методам оценки эффективности исследуемого препарата относятся:

- клиническое обследование больного (оценка жалоб, сбор анамнеза, физикальное обследование);
- регистрация частоты и выраженности кровоизлияний;
- выраженность болевого синдрома по ВАШ или другой валидной шкале;
- ведение пациентом дневника;
- регистрация уровня качества жизни по валидным шкалам (SF-36, Haemo-QOL, PedsQL, EQ-5D или др.).

### **Дизайн**

Дизайн исследований препаратов свертывания крови должен обязательно включать отмывочный период, равный по продолжительности 96 часам. Необходимый по продолжительности скрининговый период.

Предусмотренная рандомизация позволит равномерно распределить исследуемых пациентов в группу исследуемого препарата или препарата сравнения.

Важной особенностью является фармакокинетическое исследование препарата после парентерального введения, которое проводится без препарата сравнения с определением уровня исследуемого фактора свертывания крови в специально предусмотренные отрезки времени с учетом периода полувыведения исследуемого препарата.

Например: непосредственно перед введением препарата фактора свертывания крови. через 15 мин  $\pm$  5 мин, 30 мин  $\pm$  5 мин, 1 ч  $\pm$  5 мин, 3 ч  $\pm$  10 мин, 6 ч  $\pm$  15 мин, 12 ч  $\pm$  30 мин, 24 ч  $\pm$  2 ч, 48 ч  $\pm$  2 ч, 72 ч  $\pm$  2 ч для препарата фактора свертывания VIII.

### **Методика введения препарата и особенности хранения**

Препараты вводятся струйно медленно (если дизайном исследования не предусмотрено пролонгированное введение при помощи инфузомата) в течение 2-5 мин после разведения их растворителем.

Доза препарата подбирается индивидуально по массе тела пациента.

Поскольку препараты являются лиофилизированными белками, почти все они хранятся при специальном терморежиме 2-8 градусов, что требует специально оборудованного помещения для хранения и обязательную регистрацию температурного режима. При несоблюдении температурного режима активность препаратов факторов свертывания крови быстро снижается, что делает исследование недостоверным.



## ГЛАВА 20

### ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

*СОСТАВИТЕЛЬ: к. б. н. С.М. Суханова, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, Центр экспертизы и контроля МИБП*

**Диагностические питательные среды** – специальные питательные среды, предназначенные для избирательного культивирования определенных видов микроорганизмов, изучения их свойств и хранения. Они включают следующие подгруппы: среды для выращивания широкого спектра микроорганизмов, для выделения и идентификации возбудителей, дифференциальные, накопительные, транспортные (консервирующие), для определения чувствительности к антимикробным препаратам для определения стерильности лекарственных и медицинских иммунобиологических препаратов.

Испытания диагностических питательных сред предусматривают оценку их диагностической эффективности и контроль на соответствие национальным и международным требованиям. Правила проведения клинико-эпидемиологических испытаний зависят от назначения питательной среды.

Клинические исследования должны проводиться в отношении препаратов с хорошо изученными в ходе доклинического изучения физико-химическими и биологическими характеристиками.

Среды, предназначенные для работы с чистыми культурами (например, среды для идентификации микроорганизмов), должны оцениваться с помощью широкого набора музейных и свежевыделенных штаммов.

Питательные среды, предназначенные для работы с клиническим материалом (например, среды для выделения конкретного возбудителя), должны быть испытаны с помощью музейных и свежевыделенных штаммов соответствующих микроорганизмов, а также при посевах клинического материала в условиях деятельности практических лабораторий.

В случае отсутствия условий для проведения испытаний в натурных условиях допускается проведение оценки образцов питательных сред в опытах, имитирующих естественные условия – в модельных опытах. В этих случаях для посевов используют естественные материалы от здоровых лиц и объектов внешней среды (традиционно исследуемые при диагностике соответствующих инфекций), в которые вносится культура возбудителя в количестве, моделирующем ее концентрацию при естественном заражении.

Испытание вновь разрабатываемой питательной среды проводят параллельно с контрольной средой, аналогичной по своему назначению и качеству. При отсутствии среды – аналога используют несколько сред, в совокупности характеризующих свойства нового препарата. При отсутствии сухих питательных сред промышленного изготовления в качестве контрольных используют среды лабораторного изготовления.

Оценку питательной среды проводят с помощью биологических показателей, выбранных в зависимости от назначения среды и характеризующих ее диагностическую эффективность («Методы контроля бактериологических питательных сред», МУК 4.2.2316-08, М., 2008).

При испытаниях на клиническом материале или модельных опытах питательные среды следует оценивать по показателю высеваемости, определяемого отношением числа положительных находок возбудителя к числу исследуемых проб в процентах.

Учитывают также скорость роста культуры на среде, а в случае испытания плотных (агаровых) сред – количество «подозрительных» колоний (можно в условных единицах), позднее подтвержденных как положительный результат. Подтверждаются также стабильность основных биологических свойств выделенного микроорганизма при росте на исследуемой среде и чувствительность среды.

**Чувствительность среды** – определяют как максимальное разведение культуры, обеспечивающее визуально обнаруживаемый рост колоний искомого штамма в течение определенного времени и температуре на всех засеянных чашках (пробирках) с питательной средой.

Для питательных сред для идентификации, для выделения и дифференциации различных видов/родов микроорганизмов и сред для накопления отмечают эффективность подавления посторонней микрофлоры на среде.

**Ингибирующие свойства среды** – определяют как степень подавляющего воздействия на рост и (или) на проявление типичных свойств сопутствующей микрофлоры.

Показатель ингибирующих свойств выражают как:

- минимальное разведение культуры, при посеве из которой полностью отсутствует рост и (или) проявление типичных свойств посторонней микрофлоры (ингибирующие свойства) или как
- величину отношения среднего числа сформировавшихся колоний тест-штамма на «неингибиторной» среде (среда выращивания) к среднему числу колоний на испытуемой «ингибиторной» среде (показатель ингибиции) с учетом разведения.

Для сред, предназначенных для идентификации, выделения и дифференциации определяют также дифференцирующие свойства.

**Дифференцирующие свойства среды** – выраженность отличительных признаков патогенных микроорганизмов от непатогенных видов и естественных ассоциантов (по структурным особенностям колоний, их окраске, изменению цвета и др. признакам).

Дифференцирующие свойства определяют по следующим тестам:

а) выраженность дифференцирующего признака – структура колоний, цвет колоний, изменение цвета среды под колониями, ореол вокруг них, диаметр последнего, появление диффузного изменения цвета среды;

б) четкость дифференциации колоний группы патогенных микроорганизмов от непатогенных, входящих в тот же систематический таксон и от естественных ассоциантов при посеве смесей.

Среды, предназначенные для накопления микроорганизмов, оценивают по их эффективности.

**Эффективность среды** – выход микробных клеток с 1 мл питательной среды (в млрд/мл) и прирост числа микроорганизмов относительно засеянного (показатель эффективности).

Оценку качества накопительных питательных сред по показателю эффективности производят путем определения концентрации микробных клеток в среде после соответствующей инкубации.

Прирост числа микроорганизмов в накопительной среде в процессе инкубации посевов в течение соответствующего времени (t) определяют по формуле (в %):

$$\Theta = \frac{n_t \cdot K}{n_0},$$

где  $\Theta$  – показатель эффективности (прирост);

$n_t$  – среднее число колоний на чашках после инкубации культуры в жидкой (полужидкой) накопительной среде;

$n_0$  – среднее число колоний при «нулевом посеве»;

$K$  – степень разведения.

Для транспортных сред и сред для хранения (консервирующих), задерживающих размножение и рост микроорганизмов, определяют показатели сохранения жизнеспособности и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов.

При проведении испытаний оцениваются также физико-химические характеристики среды (прозрачность, растворимость), простота в приготовлении, скорость получения результатов и т.д.

Испытания проводят на базах научно-исследовательских институтов соответствующего профиля, лабораторных центрах, бактериологических лабораториях центров санитарно – эпидемиологического надзора и инфекционных больниц. Испытания в практических лабораториях проводят на территориях наиболее активных эпидемических очагов в период наибольшей высеваемости возбудителя соответствующей инфекции на данной территории. Число опытных баз определяется в зависимости от общего объема запланированных исследований и от пропускной способности лаборатории в соответствующий период, но не менее трех.

При выборе материала, подлежащего посеву на испытываемые среды, следует исходить из возможности получения большего числа положительных находок искомого возбудителя при меньших объемах исследований. Для этого в опыт берут те контингенты или объекты, при исследовании которых на данной территории регистрируется наибольшая частота высеваемости искомого возбудителя. Как правило, это больные с соответствующим диагнозом (или с подозрением). Нецелесообразно в опыте исследовать материал от здоровых лиц, обследуемых с профилактической целью.

Одним из важных моментов во время проведения испытаний является взятие материала в объеме, достаточном для посева на обе среды: опытную и контрольную, и соблюдение принципа равнозначности посева материала на опытную и контрольную питательные среды.

Посев материала на среды и последующую идентификацию выделенных культур проводят в соответствии с методиками, изложенными в действующих МУ, инструкциях, приказах по диагностике заболеваний, вызываемых соответствующими микроорганизмами.

По окончании испытаний проводится статистическая обработка результатов с определением средних величин, стандартных отклонений, вычислением коэффициента вариации, определением доверительных интервалов и достоверности различий между опытными и контрольными средами.

Испытание питательных сред должно предусматривать также определение временных затрат труда специалистов практических лабораторий на приготовление опытной и контрольной сред.

По окончании испытаний дается заключение о возможности и целесообразности использования данной среды в практическом здравоохранении.

### Термины и определения

**Дифференциально-диагностические питательные среды** – среды, предназначенные для выявления, накопления, культивирования, дифференциальной диагностики, транспортировки и хранения микроорганизмов.

**Среды для выращивания** широкого спектра микроорганизмов (жидкие, плотные) для однократного посева или длительного культивирования.

**Среды для выделения** конкретного вида возбудителя (плотные селективные, селективные).

**Среды дифференциальные**, позволяющие различить отдельные виды (группы) микроорганизмов (плотные селективные, содержащие индикаторы, красители и т. д.).

**Среды для идентификации**, позволяющие по отдельным признакам (отношение к углеводам, мочеvine и др.) проводить идентификацию микроорганизмов.

**Среды накопительные** – для обогащения конкретного вида микроорганизмов (жидкие, полужидкие селективные, селективные).

**Транспортные (консервирующие) среды** – позволяют транспортировать микроорганизмы до посева, сохраняя их жизнеспособность в течение определенного времени.

**Качество питательных сред** – совокупность свойств продукции, обуславливающих ее способность удовлетворять определенным требованиям в соответствии с назначением.

### Литература

1. «Методы контроля бактериологических питательных сред» МУК 4.2.2316-08, М., 2008.
2. Государственные испытания и регистрация новых иммунобиологических препаратов. СП 3.3.2.561-96 М., 1998.

РУКОВОДСТВО  
ПО ПРОВЕДЕНИЮ  
КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ  
(ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ  
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ)

***Часть вторая***

Верстка Гринев Д.В.  
Корректор Токарева О.Е.

Подписано в печать  
Формат 70х100/16. Печ. л. 13,25.  
Бумага офсетная. Печать офсетная.  
Тираж 500 экз. Заказ № 101.

ЗАО «Гриф и К»  
300062, г. Тула, ул. Октябрьская, 81-а.  
Тел.: (4872) 47-08-71, тел./факс: (4872) 49-76-96  
E-mail: grif-tula@mail.ru, <http://www.grif-tula.ru>