



Лекарственные препараты пыльцевых аллергенов: современные аспекты стандартизации

Е.И. Саканян¹, М.А. Ясная², В.Ф. Вуль²✉, Р.А. Бубенчиков¹, Н.В. Винокурова¹,
Е.С. Юртаева¹

¹ Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», 2-й Волконский переулок, д. 10, Москва, 127473, Российская Федерация

² НПО «Аллерген», филиал АО «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», ул. Биологическая, д. 20, Ставрополь, 355019, Российская Федерация

✉ Вуль Всеволод Феликсович; v.f.vul@microgen.ru

Резюме

Актуальность. Лекарственные препараты пыльцевых аллергенов являются наиболее востребованными. Терапевтическая польза от их применения зависит от стандартизации. Для повышения эффективности диагностики и лечения аллергических заболеваний необходимы современные методы оценки специфической (аллергенной) активности лекарственных препаратов пыльцевых аллергенов с применением стандартных образцов и методов физико-химического анализа.

Цель. Разработка методологических подходов к стандартизации лекарственных препаратов пыльцевых аллергенов для перехода к нормированию специфической активности в единицах аллергенной активности (ЕАА) и приведения качества препаратов в соответствие с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Материалы и методы. Использовали стандартные образцы пыльцевых аллергенов (АО «НПО «Микроген»), стандарт ВОЗ аллергена из пыльцы тимopheевки посевной, набор стандартов для эксклюзионной хроматографии MW 1350–670000 Da, бычий сывороточный альбумин, специфические IgE-содержащие сыворотки крови от лиц, сенсibilизированных к исследуемому аллергену, меченые антитела к IgE человека, стандартные образцы летучих растворителей для газовой хроматографии. Подтверждение подлинности стандартного образца предприятия аллергенной активности аллергена (СОП ААА) проводили методом вестерн-блота (аллергенные компоненты), содержание общего белка определяли колориметрически (метод Бредфорда). Дополнительно для изучения белковых фракций применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Количество остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов оценивали при помощи газожидкостной хроматографии.

Результаты. Вместо существующей ранее неспецифической характеристики аллергенной активности в единицах белкового азота (Protein Nitrogen Unit, PNU) был разработан и апробирован новый метод контроля специфической активности в ЕАА на основе конкурентного иммуноферментного анализа (КИФА). Разработана и валидирована методика контроля аллергенной активности *in vitro* на основе КИФА. Проведены разработка и аттестация 15 первичных СОП ААА с присвоением им аллергенной активности в ЕАА/мл по результатам тестирования методом кожных проб *in vivo*. Выполнен анализ экспериментальных данных с целью установления норм аллергенной активности для номенклатуры пыльцевых аллергенов, выпускаемых АО «НПО «Микроген». Разработаны и валидированы в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации физико-химические методы аттестации СОП ААА. Определены условия хроматографического разделения

остаточных органических растворителей (ацетона, диэтилового эфира) и параметры пригодности хроматографической системы. Проведена аттестация вторичных СОП ААА методом КИФА по показателю аллергенной активности относительно первичных СОП, что позволило перейти к стандартизации препаратов аллергенов методом *in vitro*.

Выводы. Разработана методология стандартизации препаратов аллергенов методом КИФА по степени ингибирования иммунологической реакции в сравнении со стандартным образцом. Обоснована целесообразность исключения показателя «Содержание белкового азота» (в ЕАА). Полученные СОП ААА впервые на предприятии были аттестованы в ЕАА. Разработана и валидирована аналитическая методика определения количественного содержания остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов с помощью метода газожидкостной хроматографии.

Ключевые слова: лекарственные препараты пыльцевых аллергенов; специфическая активность; остаточные органические растворители; общий белок; КИФА

Для цитирования: Саканян Е.И., Ясная М.А., Вуль В.Ф., Бубенчиков Р.А., Винокурова Н.В., Юртаева Е.С. Лекарственные препараты пыльцевых аллергенов: современные аспекты стандартизации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3-1):367-378. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-367-378>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Pollen allergen products: current standardisation issues

Elena I. Sakanyan¹, Maria A. Yasnaya², Vsevolod F. Vul²✉, Roman A. Bubenchikov¹, Natalya V. Vinokurova¹, Ekaterina S. Yurtaeva¹

¹ Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, 10 2nd Volkonsky Ln., Moscow 127473, Russian Federation

² Allergen, Branch of Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, 20 Biologicheskaya St., Stavropol 355019, Russian Federation

✉ Vsevolod F. Vul; v.f.vul@microgen.ru

Abstract

Scientific relevance. Pollen allergen medicines are in high demand, and their therapeutic benefits directly correlate with their standardisation. Better diagnosis and treatment of allergic diseases require state-of-the-art procedures for assessing the allergenic activity of pollen allergen products using reference standards and physicochemical testing methods.

Aim. The study aimed at developing methodological approaches to the standardisation of pollen allergen products in order to shift to measuring their potency in allergenic activity units (AAU) and bring their quality in line with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

Materials and methods. The study used pollen allergen reference standards by Microgen, the WHO International Standard for timothy grass (*Phleum pratense*) pollen extract, a gel filtration standard kit of molecular weight markers ranging from 1.35 to 670 kDa, bovine serum albumin, serum samples with specific IgE obtained from donors sensitised to the study pollen allergens, labelled anti-human IgE antibodies, and reference standards for determining residual volatile solvents by gas chromatography. The identification of in-house reference standards for the potency of pollen allergens involved Western blotting (for allergenic components). The total protein content was determined by Bradford's assay. In addition, the authors used high-performance liquid chromatography to study protein fractions and gas-liquid chromatography to determine the content of residual organic solvents.

Results. To substitute the existing method of non-specific characterisation of allergenic activity in protein nitrogen units (PNU), the authors developed and tested a new method to control allergenic activity in allergenic activity units (AAU) based on an *in vitro* competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedure developed and validated in this study. Furthermore, the authors developed and certified 15 primary in-house reference standards with allergenic activity established in AAU/mL using skin tests *in vivo*. The experimental data were analysed to standardise the allergenic activity of the pollen allergens manufactured by Microgen. The authors developed physicochemical methods for the certification of in-house reference standards and validated these methods in accordance with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. The study involved selecting chromatographic separation conditions for residual organic solvents (acetone and diethyl ether) and establishing system suitability criteria for the chromatographic system. The allergenic activity of secondary in-house reference standards was certified against that of primary in-house reference standards using competitive ELISA. Thus, the authors managed to shift to the standardisation of pollen allergen products *in vitro*.

Conclusions. The authors developed their competitive ELISA-based method to standardise pollen allergen products by comparing the inhibition of immune responses to a product and a standard. The study demonstrated the feasibility of substituting allergenic activity quantification (in AAU) for protein nitrogen content determination (in PNU) and showed the first example of using AAU for the certification of in-house reference standards. Additionally, the authors developed and validated an analytical procedure for determining the content of residual organic solvents in pollen allergen products by gas-liquid chromatography.

Key words: medicinal products of pollen allergens; potency; allergenic activity; residual organic solvents; total protein; competitive enzyme-linked immunosorbent assay

For citation: Sakanyan E.I., Yasnaya M.A., Vul V.F., Bubenchikov R.A., Vinokurova N.V., Yurtaeva E.S. Pollen allergen products: current standardisation issues. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3-1):367-378. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-367-378>

Funding. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

В настоящее время перед национальными системами здравоохранения остро стоит проблема профилактики и лечения аллергических заболеваний, которым подвержена значительная часть населения земного шара [1–4]. По некоторым оценкам, 20–30% от общего числа населения планеты имеют аллергические заболевания [5]. Наряду с известными ранее видами аллергии (на пищу, растения, домашнюю и библиотечную пыль, шерсть диких и домашних животных и др.) появилась и становится все более распространенной медикаментозная аллергия (на лекарственные средства). С 1960-х годов, особенно в последние 10–20 лет, наблюдается стремительный рост числа пациентов с аллергическими заболеваниями. Проявления аллергических заболеваний приводят к ухудшению качества жизни, ограничивают возможности во всех сферах социальной и личной жизни. Аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) – современный метод лечения аллергии, в основе которого лежит использование механизма и патогенеза аллергических заболеваний [6–9]. Принцип

АСИТ – поэтапное введение в организм пациента возрастающих доз аллергенсодержащего лекарственного препарата (ЛП) для снижения чувствительности к аллергену [6, 10].

Следует отметить, что преобладающие позиции (от 1 до 5% от общего числа аллергических заболеваний) занимают аллергические реакции на растительную пыльцу, при этом их проявления разнообразны, а признаки ринита могут отсутствовать [11]. Для проведения АСИТ используют ЛП на основе действующих веществ – аллергенов и алергоидов, которые произведены из пыльцы растений и вызывают положительный аллергический ответ [8].

Обеспечение качества, эффективности и безопасности ЛП аллергенов – ключевая задача производителя, которая требует внедрения не только современных технологий, но и соответствующих методов стандартизации и последующего контроля качества ЛП аллергенов. Это подразумевает переход от оценки специфической активности ЛП аллергенов с использованием методов *in vivo* (кожные пробы) к методу определения аллергенной активности *in vitro*

относительно стандартных образцов (СО), аттестованных в единицах аллергенной активности (ЕАА/мл) с помощью разработанных и валидированных методик конкурентного иммуноферментного анализа (КИФА).

На сегодняшний день единой международной системы единиц аллергенной активности не существует, и мировые производители лекарственных средств переходят на использование различных унифицированных единиц аллергенной активности. Это позволяет количественно оценить специфическую активность ЛП аллергенов и исходных фармацевтических субстанций (табл. 1) [1].

Анализ данных *таблицы 1* позволяет сделать заключение о том, что практически во всех представленных вариантах проводится сравнительная оценка результатов кожных проб и далее их перевод в единицы специфической (аллергенной) активности.

Всемирная организация здравоохранения предложила к использованию ограниченное число международных стандартов аллергенных экстрактов [12]. Перечень международных СО включает лишь пять наименований, что создает очевидные сложности для стандартизации лекарственных средств аллергенов и по-

Таблица 1. Характеристика единиц аллергенной активности лекарственных препаратов аллергенов (таблица составлена авторами по данным источника [1])

Table 1. Units of allergenic activity of pollen allergen products (compiled by the authors based on [1])

Единица аллергенной активности <i>Unit of allergenic activity</i>	Характеристика <i>Description</i>	Регион применения / Регуляторный орган / Компания <i>Region / Regulatory authority / Company</i>
BAU – биоэквивалентная аллергенная единица <i>BAU, Bioequivalent Allergenic Unit</i>	100 000 BAU эквивалентны разведению аллергена 3×10^{-14} , при котором размер эритемы достигает 50 мм у каждого испытуемого (15–20 пациентов) <i>100,000 BAU are equivalent to the 3×10^{-14} dilution of the allergen with an erythema diameter sum of 50 mm in each patient (15–20 patients)</i>	FDA (США) <i>FDA (USA)</i>
HEP – гистаминоэквивалентная единица/ BU, биологические единицы <i>HEP, Histamine Equivalent Prick unit/ BU, Biological Unit</i>	HEP – единица, соответствующая развитию кожной реакции (15–20 пациентов), эквивалентной таковой при воздействии раствора гистамина в концентрации 10 мг/мл, приравняется к 1000 BU (биологических единиц) <i>A HEP unit corresponds to the allergen concentration that elicits the same wheal size in skin prick testing as the histamine dihydrochloride control at 10 mg/mL. 1 HEP unit is equivalent to 1000 biological units (BU)</i>	FDA (США), ALK-Abello (Дания) <i>FDA (USA), ALK-Abello (Denmark)</i>
JSK – единица стандартного качества <i>JSK, standard quality unit (Jednotka Standardní Kvality)</i>	Прик-тест (20 пациентов) <i>Prick testing (20 patients)</i>	Sevapharma (Чехия) <i>Sevapharma (Czech Republic)</i>
IR – индекс реактивности <i>IR, Index of Reactivity</i>	100 IR соответствуют дозе аллергена, вызывающего развитие кожной реакции (папула диаметром 7 мм). Прик-тест (30 пациентов) <i>Prick testing with three serial dilutions, 30 patients, and a 9% codeine phosphate control. 100 IR is equal to the allergen dose that elicits a wheal with a diameter of 7 mm</i>	Stallergenes Greer (Франция) <i>Stallergenes Greer (France)</i>
BU – биологические единицы <i>BU, Biological Unit</i>	Накожные пробы (30 пациентов). 100 BU соответствуют дозе аллергена, вызывающего развитие кожной реакции (папула диаметром 7 мм) <i>Prick testing (30 patients) 100 BU correspond to the allergen dose that elicits a wheal with a diameter of 7 mm</i>	Страны Северной Европы <i>Nordic countries</i>
UBE – единицы биологических эквивалентов <i>UBE, biological equivalent units (Unidades Biológicas Equivalentes)</i>	Двойной прик-тест (три серийных разведения, 30 пациентов). Концентрация раствора гистамина – 0,1 мг/мл <i>Double prick test with three serial dilutions, 30 patients, and a 0.1 mg/mL histamine solution</i>	IPI-Asac (Испания) <i>IPI-ASAC (Spain)</i>
ЕАА – единицы аллергенной активности <i>AAU, Allergenic Activity Units</i>	100 000 ЕАА соответствуют значению разведения, которое вызывает развитие кожной реакции у сенсibilizированных пациентов в виде папулы (8 мм) ^а <i>100,000 AAU correspond to the dilution that elicits a wheal^a with a diameter of 8 mm in sensitised patients</i>	АО «НПО «Микроген» (Российская Федерация) <i>Microgen (Russian Federation)</i>

^а ОФС.1.7.2.0040.18 Определение специфической (аллергенной) активности аллергенов и аллергоидов методом кожных проб. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

^а OFS.1.7.2.0040.18 Determination of potency (allergenic activity) of allergens and allergoids by prick testing. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. V. 2. Moscow; 2018.

следующего рутинного контроля их качества, подтверждающего единообразие аллергенной активности. В связи с этим перед производителями встает вопрос разработки собственных первичных и вторичных стандартных образцов предприятий (СОП), предназначенных для использования при контроле качества с применением метода КИФА.

Цель работы – разработка методологических подходов к стандартизации лекарственных препаратов пыльцевых аллергенов для перехода к нормированию специфической активности в единицах аллергенной активности (ЕАА) и приведения качества препаратов в соответствие с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ).

Задачи исследования:

- разработка первичных СОП аллергенной активности аллергена (СОП ААА) для выпускаемой АО «НПО «Микроген» номенклатуры аллергенов, установление норм их аллергенной активности;
- разработка и валидация методики КИФА контроля аллергенной активности *in vitro*;
- разработка и валидация хроматографических методов для подтверждения подлинности и показателей качества выпускаемой продукции;
- аттестация вторичных СОП ААА с использованием разработанных методов, переход к стандартизации препаратов аллергенов *in vitro*.

Материалы и методы

Материалы

1. СОП ААА из пыльцы ржи посевной, тимopheевки луговой, полыни горькой, березы висячей, ежи сборной, орешника (лещины обыкновенной), дуба черешчатого, ольхи клейкой, амброзии полыннолистной, овсяницы луговой, костра прямого, мятлика лугового, подсолнечника однолетнего, одуванчика лекарственного, циклахины дурнишниковидной, а также соответствующие аллергенные пыльцевые экстракты (маточные), изготовленные по действующему промышленному регламенту. Производитель: НПО «Аллерген», Ставрополь (филиал АО «НПО «Микроген»).
2. WHO International Standard Timothy Pollen Extract – международный стандарт аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (Нацио-

нальный институт биологических стандартов и контроля, NIBSC), код 82/520, активность 100 000 IU (МЕ) / ампула [13]. Стандарт восстанавливали в 1 мл деионизированной воды до концентрации 100 000 IU/мл. Для последующего анализа использовали восстановленный стандарт тимopheевки луговой в концентрации 10 000 IU/мл.

3. Стандарт для эксклюзионной хроматографии Gel Filtration Standard, молекулярная масса 1,350–670,000 кДа, рI 4,5–6,9 (Bio-Rad Labs, США, кат. № 151–1901).
4. Бычий сывороточный альбумин, фракция V A6588,0100 (AppliChem, Германия).
5. Сыворотки крови пациентов, содержащие IgE-антитела (положительные) к аллергенам из пыльцы (класс 3–4 специфической активности).
6. Конъюгат антител моноклональных диагностических против тяжелых (эпсилон) полипептидных цепей иммуноглобулинов (IgE) человека, меченных пероксидазой хрена (ООО «Полигност», Россия).
7. Стандартные образцы диэтилового эфира, ацетона и растворителя диметилсульфоксида, для газожидкостной хроматографии (Merck KGaA, Германия), чистота не менее 99,9%.

Методы

Электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн-блот. Испытания СОП ААА проводили согласно требованиям ОФС.1.7.1.0001.15¹ по показателям: «Белковый профиль» (электрофорез в полиакриламидном геле – ПААГ, ВЭЖХ) и «Подлинность» (вестерн-блот). Электрофорез в ПААГ (15%) с натрия додецилсульфатом (SDS) в восстанавливающих условиях (в присутствии дитиотреитола) проводили с использованием системы для вертикального электрофореза Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad Labs, США, кат. № 165–8004) [2]. Приготовление 15% ПААГ, электрофорез, окрашивание ПААГ красителем Coomassie R-250 (Serva, Германия, кат. № 1752501) осуществляли в соответствии с ОФС.1.2.1.0023.15². Определение подлинности выполняли методом вестерн-блота в присутствии аллерген-специфических сывороток в соответствии с ОФС.1.7.2.0022.15³. Образцы концентрировали с помощью микроконцентраторов Amicon Ultra-0.5 (Merck, Германия, #UFC5010BK).

¹ ОФС.1.7.1.0001.15 Аллергены. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

² ОФС.1.2.1.0023.15 Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

³ ОФС.1.7.2.0022.15 Определение подлинности и чистоты иммунобиологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

Эксклюзионная хроматография. Хроматографический анализ аллергенных пыльцевых экстрактов (кандидатов в СОП ААА) проводили при соблюдении фармакопейных требований методом эксклюзионной хроматографии в изократическом режиме элюирования. Для анализа использовали хроматографическую систему Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Германия) с колонкой Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare, Швеция). Для детекции применяли флуориметрический детектор в режиме длин волн возбуждения (испускания) $\lambda_{\text{ex}}=280$ ($\lambda_{\text{em}}=345$) нм. Элюирование выполняли фосфатным буферным раствором с концентрацией 10 мМ (рН 6,8), содержащим натрия хлорида (0,4 М) и Твин 20 (0,02%), модифицированным ацетонитрилом (соотношение фосфатного буферного раствора и ацетонитрила 4:1), со скоростью 0,5 мл/мин. Объем ввода – 50 мкл. Образцы аллергенных препаратов, представляющие собой водно-солевые растворы белково-полисахаридных комплексов, выделенных из пыльцы растений экстрагированием фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,0), с содержанием белкового азота от 7500 до 12 500 PNU/мл, использовали без предварительной пробоподготовки. Приготовление стандарта для эксклюзионной хроматографии проводили в соответствии с рекомендациями производителя, затем разводили в 100 раз в подвижной фазе. Раствор бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 1 мг/мл готовили методом точной навески, разводили в подвижной фазе до концентрации 0,025 мг/мл [2].

Метод конкурентного иммуноферментного анализа. Биологическая активность первой серии СОП ААА должна быть подтверждена методом кожных проб (тест *in vivo*) в ходе клинических исследований у лиц, сенсibilизированных к исследуемому аллергену, с выражением результата в единицах аллергенной активности (ЕАА/мл)⁴. Биологическую активность второй (и последующих) серии СОП ААА оценивали методом КИФА *in vitro* с использованием специфических сывороток, содержащих IgE-антитела, относительно действующих (первичной и последующих) серий СОП ААА. Исследуемый аллерген связывается со специфическими IgE-антителами

и ингибирует их взаимодействие с СОП ААА, иммобилизованным на твердой фазе. Степень ингибирования прямо пропорциональна содержанию аллергена в растворе. Предварительно СОП ААА и образец анализируемой серии разводили в 5 раз, затем последовательно с шагом в 2 раза готовили до 6 разведений, к которым добавляли содержащие IgE-антитела специфические сыворотки, относительно действующих (первичной и последующих) серий СОП ААА. Образовавшиеся на твердой фазе иммунные комплексы связывали с конъюгатом моноклональных антител к IgE человека, меченных пероксидазой хрена (ООО «Полигност», Россия). После инкубации останавливали реакцию внесением раствора тетраметилбензидина и проводили учет результатов КИФА на фотометре iMark (Bio-Rad Labs, США) для микропланшетов при длине волны 450 нм, относительно воздуха в пустой лунке.

Кожные пробы. Определение специфической (аллергенной) активности первой серии СОП проводили в соответствии с рекомендованной методикой ОФС.1.7.2.0040.18⁵. Учитывали кожную реакцию – волдыри, а также гиперемия у людей с повышенной чувствительностью к исследуемому аллергену в анамнезе (или без таковой у представителей контрольной группы). Использовали метод постановки кожных проб (прик-тест и скарификация) у 15–20 лиц, сенсibilизированных к исследуемому аллергену, в возрасте от 18 до 60 лет в период ремиссии заболевания (риноконъюнктивит, бронхит, бронхиальная астма).

Клинические исследования проводили с соблюдением норм и требований, изложенных в международных и российских законодательных актах, регулирующих вопросы биоэтики и защиты прав пациента⁶. Испытания проводили в соответствии с Решением Совета ЕЭК № 79 от 03.11.2016⁷. Исследования рассмотрены и одобрены на заседаниях Комитета по этике АНО «Научно-исследовательский институт общественного здоровья», заседания проводились на базе СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 43» (выписка из протокола № 1 от 17.08.2018, выписка из протокола № 1-25/05/18 от 25.05.2018, выписка из протокола № 2-25/05/18 от 25.05.2018). На проведение клинических исследований

⁴ ОФС.1.7.2.0040.18 Определение специфической (аллергенной) активности аллергенов и алергоидов методом кожных проб. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

⁵ Там же.

⁶ Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации. Этические принципы медицинских исследований с привлечением человека. Форталеа; 2013. http://acto-russia.org/index.php?option=com_content&task=view&id=21

⁷ Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 79 от 03.11.2016 «Об утверждении Правил надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза». <https://docs.cntd.ru/document/456026110>

получены разрешения Минздрава России № 652 от 14.12.2017, № 674–680 от 21.12.2017, № 24–26 от 24.01.2018, № 70, 71 от 20.02.2018, № 73, 76, 77 от 21.02.2018, № 64 от 02.02.2022.

Определение остаточных органических растворителей (ацетон, диэтиловый эфир). Согласно ОФС 1.1.0008.15⁸ содержание органических растворителей в ЛП аллергенов не должно быть более 0,5% (5000 ppm). Определение проводили методом газовой хроматографии в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0004.15⁹.

Для разработки аналитической методики определения количественного содержания ацетона и диэтилового эфира и ее валидации использовали следующее оборудование:

- кварцевая колонка Zebtron ZB-624, длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 1,8 мкм (кат. № 1023593);
- газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором «Кристаллюкс-4000М» (ООО «НПФ Мета-хром», Россия).

Регистрировали хроматограммы растворителя (вода для инъекций), испытуемого образца ЛП аллергена, раствора СО ацетона и диэтилового эфира, измеряли время удерживания и площади пиков. Площади пиков ацетона и диэтилового эфира на хроматограмме испытуемого образца аллергена не должны превышать соответствующие площади на хроматограммах растворов СО.

Результаты и обсуждение

Исследование состояло из следующих этапов:

- разработка и аттестация первичных СОП ААА для номенклатуры аллергенов с присвоением аллергенной активности в ЕАА/мл по результатам тестирования методом кожных проб *in vivo*;
- разработка методик КИФА контроля аллергенной активности *in vitro* и их валидация;
- анализ экспериментальных данных с целью установления норм аллергенной активности для пыльцевых аллергенов, выпускаемых АО «НПО «Микроген»;
- разработка и валидация физико-химических методик аттестации СОП ААА, регламентированных ГФ РФ;

- внесение изменений в нормативную документацию аллергенов, выпускаемых АО «НПО «Микроген»;
- контроль стабильности по показателю аллергенной активности (испытание 3-х экспериментальных серий препаратов аллергенов);
- аттестация вторичных СОП ААА методом КИФА относительно первичных СОП по показателю аллергенной активности, т.е. переход к стандартизации ЛП аллергенов методом *in vitro*.

Производство и аттестация стандартных образцов предприятия лекарственных препаратов аллергенов

Стандартный образец предприятия аллергенной активности представляет собой одну из серий аллергенного экстракта или готового препарата.

Аттестуемая характеристика первичного СОП – аллергенная активность. Устанавливается в рамках проведения клинических исследований в соответствии с ОФС 1.7.2.0040.18¹⁰.

Аллергенную активность в настоящей работе выражали в ЕАА/мл, при этом в качестве активности 100 000 ЕАА/мл принимали значение разведения, которое вызывает развитие кожной реакции у сенсibilизированных лиц в виде волдыря диаметром 8 мм. Расчет аллергенной активности СОП ААА и статистическую обработку данных проводили в соответствии с ОФС.1.7.2.0040.18¹¹ и ОФС.1.1.0013.15¹² (результаты представлены в табл. 2).

Дополнительные исследуемые характеристики (метод): белковый профиль (ВЭЖХ), белковый профиль (электрофорез), подлинность (вестерн-блот). Выявлены полосы преципитации белков с ожидаемыми для главных и второстепенных аллергенных компонентов M_r в области 45–65, 27–35 и менее 20 кДа. Полученные профили специфических аллергенных компонентов показали высокую степень сходства образцов производства АО «НПО «Микроген» с международным стандартом аллергена из пыльцы тимовоевки луговой (NIBSC code: 82/520) (рис. 1).

Данный СОП ААА предназначен для аттестации последующих серий СО и контроля текущих производственных серий препаратов методом

⁸ ОФС.1.1.0008.15 Остаточные органические растворители. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁹ ОФС.1.2.1.2.0004.15 Газовая хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

¹⁰ ОФС.1.7.2.0040.18 Определение специфической (аллергенной) активности аллергенов и алергоидов методом кожных проб. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018

¹¹ Там же.

¹² ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

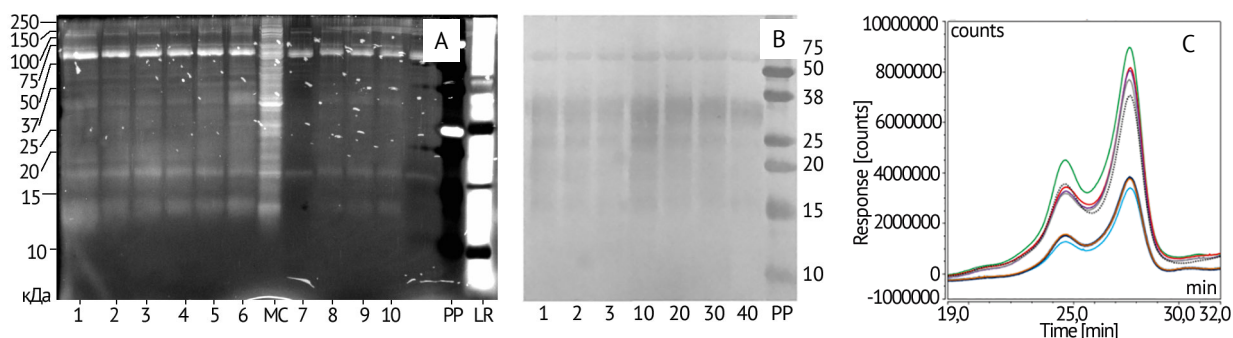


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Белковый и аллергенный профили производственных серий лекарственного препарата аллергена из пыльцы тимовейки луговой: А – электрофорез в полиакриламидном геле; В – вестерн-блот; аллергенные специфические компоненты в виде полос преципитации; 1–6, 7–10 – производственные серии (А, В); 10–40 – маточные экстракты (В); С – ВЭЖХ. МС – Международный стандарт 82/520; PP, LR – маркеры молекулярных масс; производственные серии: голубым цветом – С2301, синим – С2302, оранжевым – С2310, зеленым – С2310, красным – С2311, фиолетовым – С2312, серым – С2314, черным – С2315.

Fig. 1. Protein and allergenic profiles of production batches of a timothy grass pollen allergen product. A, polyacrylamide gel electrophoresis; B, Western blot; Specific allergen components as precipitation bands; 1–6 and 7–10, production batches; 10–40, stock extracts (A, B). C, high-performance liquid chromatography. IS, International Standard (NIBSC code: 82/520); PP, LR, molecular weight markers. Production batches: cyan, C2301; blue, C2302; orange, C2310; green, C2310; red, C2311; purple, C2312; grey, C2314; and black, C2315.

КИФА для определения аллергенной активности *in vitro*.

Активность испытуемой серии в единицах ЕАА устанавливали относительно СОП ААА по степени ингибирования иммунологической реакции при добавлении аллерген-специфических сывороток (табл. 2). Данные методы позволили провести аттестацию первичных СОП аллергенной активности ряда пыльцевых аллергенов по показателю «Специфическая активность».

При последующей аттестации вторичных СОП использовали аттестованные значения СОП пыльцевых аллергенов.

Была приведена в соответствие с XIV изданием ГФ РФ нормативная документация для 15 исследуемых аллергенов (табл. 2).

Разработка аналитической методики определения количественного содержания остаточных органических растворителей в лекарственных препаратах аллергенов

В технологическом процессе при производстве ряда ЛП пыльцевых аллергенов используются органические растворители класса токсичности 3 – диэтиловый эфир и (или) ацетон, предельно допустимое содержание которых не должно превышать 0,5% (5000 ppm).

Количество остаточных органических растворителей в ЛП аллергенов определяли при помощи метода газожидкостной хроматографии и разработанной аналитической методики.

В результате исследований были определены оптимальные условия хроматографического разделения ацетона и диэтилового эфира на капиллярной кварцевой колонке газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектором. Расход воздуха в детекторе – 400 мл/мин, водорода – 40 мл/мин.

Характеристики капиллярной кварцевой колонки Zebtron ZB-624 (кат. № 1023593): длина – 30 м, внутренний диаметр – 0,32 мм, толщина пленки – 1,8 мкм; скорость подачи газа-носителя (гелий) – 1,5 мл/мин; деление потока – 50:1; начальная температура термостата колонки +40 °С (в течение 5 мин), подъем температуры до +240 °С со скоростью 25 °С/мин, затем выдержка в течение 1 мин; температура инжектора +250 °С; температура детектора +260 °С; объем вводимого испытуемого раствора – 1,0 мкл; время хроматографирования – 14 мин [14].

Определены параметры пригодности хроматографической системы (табл. 3). Валидацию разработанной методики проводили по следующим характеристикам: специфичность, линейность, предел количественного определения, правильность и прецизионность [14]. Показатели, установленные на основании проведенных валидационных исследований, позволяют охарактеризовать данную методику как специфичную, точную и достоверную.

Проведенный в соответствии с разработанной методикой анализ ЛП аллергенов свидетельствует о том, что во всех препаратах содержание остаточных органических растворителей

Таблица 2. Аллергенная активность СОП ААА
Table 2. Allergenic activity of in-house reference standards for allergenic activity of allergens

Наименование СОП <i>In-house RS name</i>	Специфическая (аллергенная) активность, ЕАА/мл <i>Allergenic activity, AAU/mL</i>	ДИ (95%) <i>CI (95%)</i>
Аллерген из пыльцы тимopheевки луговой (<i>Phleum pratense</i>) <i>Pollen allergen of timothy grass (Phleum pratense)</i>	138 700	±22 550
Аллерген из пыльцы ржи посевной (<i>Secale cereale</i>) <i>Pollen allergen of cultivated rye (Secale cereale)</i>	177 300	±31 300
Аллерген из пыльцы полыни горькой (<i>Artemisia absinthium</i>) <i>Pollen allergen of common wormwood (Artemisia absinthium)</i>	204 000	±37 390
Аллерген из пыльцы березы повислой (<i>Betula pendula</i>) <i>Pollen allergen of European white birch (Betula pendula)</i>	112 800	±25 670
Аллерген из пыльцы ежи сборной (<i>Dactylis glomerata</i>) <i>Pollen allergen of cocksfoot grass (Dactylis glomerata)</i>	235 700	±29 210
Аллерген из пыльцы орешника (лещины обыкновенной) (<i>Corylus avellana</i>) <i>Pollen allergen of common hazel (Corylus avellana)</i>	149 600	±16 030
Аллерген из пыльцы дуба черешчатого (<i>Quercus robur</i>) <i>Pollen allergen of pedunculate oak (Quercus robur)</i>	148 300	±17 510
Аллерген из пыльцы ольхи клейкой (<i>Alnus glutinosa</i>) <i>Pollen allergen of common alder (Alnus glutinosa)</i>	112 000	±16 890
Аллерген из пыльцы амброзии полыннолистной (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>) <i>Pollen allergen of common ragweed (Ambrosia artemisiifolia)</i>	88 700	±14 620
Аллерген из пыльцы овсяницы луговой (<i>Festuca pratensis</i>) <i>Pollen allergen of meadow fescue (Festuca pratensis)</i>	131 400	±22 078
Аллерген из пыльцы костера прямого (<i>Bromus erectus</i>) <i>Pollen allergen of upright brome (Bromus erectus)</i>	69 600	±12 546
Аллерген из пыльцы мятлика лугового (<i>Poa pratensis</i>) <i>Pollen allergen of meadow grass (Poa pratensis)</i>	101 300	±15 334
Аллерген из пыльцы подсолнечника однолетнего (<i>Helianthus annuus</i>) <i>Pollen allergen of common sunflower (Helianthus annuus)</i>	101 800	±18 146
Аллерген из пыльцы одуванчика лекарственного (<i>Taraxacum officinale</i>) <i>Pollen allergen of common dandelion (Taraxacum officinale)</i>	118 800	±19 444
Аллерген из пыльцы циклахины дурнишниковидной (<i>Cyclachaena xanthiifolia</i>) <i>Pollen allergen of giant sumpweed (Cyclachaena xanthiifolia)</i>	62 800	±10 723

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. СОП ААА – стандартный образец предприятия аллергенной активности аллергена; ДИ – доверительный интервал.

Note. RS, reference standard; CI, confidence interval.

Таблица 3. Параметры пригодности хроматографической системы для диэтилового эфира и ацетона ($n=6$) (таблица заимствована авторами из источника [14])

Table 3. Parameters of suitability of the chromatographic system for diethyl ether and acetone ($n=6$) (cited by the authors from [14])

Органический растворитель, RSD <i>Organic solvent, RSD</i>	RT, мин <i>RT, min</i>	S, мЕОП×с <i>S, mAU×s</i>	A _s	Число теоретических тарелок <i>Theoretical plate number</i>
Диэтиловый эфир <i>Diethyl ether</i>	4,439	649	1,06	43 685
	4,440	645	1,06	42 547
	4,441	638	1,06	42 896
	4,439	635	1,05	43 245
	4,440	641	1,07	43 587
	4,441	643	1,06	42 987
RSD, %	0,02	0,80	–	–
Ацетон <i>Acetone</i>	5,123	750	1,07	51 948
	5,124	776	1,07	51 547
	5,122	771	1,08	51 014
	5,125	760	1,07	52 145
	5,122	759	1,08	52 578
	5,124	772	1,08	52 025
RSD, %	0,02	1,30	–	–

Примечание. RSD – максимальное относительное стандартное отклонение; RT – время удерживания; S – площадь пика; A_s – фактор асимметрии пиков.

Note. RSD, relative standard deviation; RT, retention time; S, peak area; AU, absorbance units; A_s, asymmetry factor.

отвечает требованиям ОФС.1.1.0008.15¹³ и составляет не более 0,5%: диэтиловый эфир – 0,0053–0,0524%, ацетон – 0,0029–0,0994%.

Заключение

В результате выполненных работ получены и впервые в практике предприятия аттестованы в единицах аллергенной активности (ЕАА) 15 первичных СОП аллергенов на выпускаемую номенклатуру. Переход от неспецифической характеристики аллергенной активности, выраженной в единицах белкового азота (PNU), к количественно определяемому специфическому показателю «Аллергенная активность» (в ЕАА) позволяет проводить последующую стандартизацию вторичных СОП аллергенной активности аллергенов по их специфической активности точным и воспроизводимым методом конкурентного иммуноферментного анализа. В результате обосновано предложение по исключению ранее применявшегося неселективного метода определения белкового азота. Разработка и валидация методики хроматографического определения остаточных органических растворителей позволили повысить качество и безопасность выпускаемой продукции.

Нормативная документация для аллергенов из пыльцы тимopheевки луговой, ржи посевной, полыни горькой, березы висячей, ежи сборной, орешника (лещины обыкновенной), дуба черешчатого, ольхи клейкой, амброзии полыннолистной, овсяницы луговой, костра прямого, мятлика лугового, подсолнечника однолетнего, одуванчика лекарственного, циклахены дурнишниковидной была приведена в соответствие с XIV изданием Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Получены регистрационные удостоверения на заявленные лекарственные препараты пыльцевых аллергенов с внесенным методом конкурентного иммуноферментного анализа, при помощи которого предлагается проводить контроль лекарственных препаратов по показателю «Аллергенная (специфическая) активность». Проведена аттестация вторичных СОП, используемых в рутинном контроле качества выпускаемых предприятием лекарственных препаратов пыльцевых аллергенов.

Представляется необходимым привлечение внимания научного сообщества к вопросу исключения показателя «Содержание белкового азота» в PNU как основной характеристики специфической активности лекарственных пре-

¹³ ОФС.1.1.0008.15 Остаточные органические растворители. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

паратов аллергенов и замены его на показатель «Аллергенная активность» в ЕАА, более точно

характеризующий степень выраженности специфической активности.

Литература/References

1. Невская ЛВ, Лавренчик ЕИ, Жданова МЮ, Фадейкина ОВ, Капитанова ВК. Международный опыт стандартизации препаратов аллергенов. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(4):222–9.
Nevskaya LV, Lavrenchik EI, Zhdanova MYu, Fadeyukina OV, Kapitanova VK. International practice of allergen products standardization. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(4):222–9 (In Russ.).
EDN: [ZXGLKT](https://doi.org/10.1097/aci.0000000000000533)
2. Цымбаревич ИВ, Ефимова ИС, Калинин СП, Зубков АВ, Мазурина СА, Михайлова НА, Зубкова НВ. Характеристика кандидата в стандартные образцы аллергена из пыльцы тимотея луговой по белковому профилю и специфическим аллергенным компонентам. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(2):92–7.
Tsyymbarevich IV, Efimova IS, Kalinin SP, Zubkov AV, Mazurina SA, Mikhailova NA, Zubkova NV. Characterization of the candidate reference material of timothy pollen allergen extract in terms of protein profile and specific allergenic components. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(2):92–7 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-92-97>
3. Bastl K, Bastl M, Bergmann K-C, Berger M, Berger U. Translating the burden of pollen allergy into numbers using electronically generated symptom data from the patient's hayfever diary in Austria and Germany: 10-year observational study. *J Med Internet Res*. 2020;22(2):e16767.
<https://doi.org/10.2196/16767>
4. Kiguchi T, Yamamoto-Hanada K, Saito-Abe M, Sato M, Irahara M, Ogita H, et al. Pollen-food allergy syndrome and component sensitization in adolescents: A Japanese population-based study. *PLoS One*. 2021;16(4):e0249649.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249649>
5. Та V, Scott DR, Chin WK, Wineinger NE, Kelso JM, White AA. Differential skin test reactivity to pollens in pollen food allergy syndrome versus allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc*. 2015;36(5):379–85.
<https://doi.org/10.2500/aap.2015.36.3862>
6. Таубэ АА, Буянова ТА, Саканян ЕИ. Минимизация рисков применения лекарственных препаратов на основе пыльцы на стадии заготовки сырья. *Фармация и фармакология*. 2022;10(2):154–63.
Taube AA, Buyanova TA, Sakanyan EI. Minimisation of risks associated with the use of pollen-based medicines, at the stage of pollen collection. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(2):154–63 (In Russ.).
<https://doi.org/10.19163/2307-9266-2022-10-2-154-163>
7. Yagami A, Ebisawa M. New findings, pathophysiology, and antigen analysis in pollen-food allergy syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2019;19(3):218–23.
<https://doi.org/10.1097/aci.0000000000000533>
8. Петрова СЮ, Бержец ВМ, Петрова НС, Хрулева ВА, Емельянов ОЮ, Хлгатын СВ, Коренева ЕА. Перспективы развития лечебных форм аллергенов. От абстрактных проблем к конкретным решениям. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2018;(1):40–7.
Petrova SYu, Berzhets VM, Petrova NS, Hrulyova VA, Emelyanova OYu, Hlgatyan SV, Koreneva EA. Future prospect of allergen therapeutic forms. From abstract problems towards specific solutions. *International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2018;(1):40–7 (In Russ.).
<https://doi.org/10.14427/jipai.2018.1.40>
9. Fortescue R, Kew KM, Tsun Leung MS. Sublingual immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;9(9):CD011293.
<https://doi.org/10.1002/14651858.cd011293.pub3>
10. Asero R, Mistrello G, Amato S. Detection of pan-allergens in commercial pollen extracts for allergen immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2016;117(2):180–5.
<https://doi.org/10.1016/j.anai.2016.05.010>
11. Poncet P, Sénéchal H, Charpin D. Update on pollen-food allergy syndrome. *Rev Clin Immunol*. 2020;16(6):561–78.
<https://doi.org/10.1080/1744666x.2020.1774366>
12. Zimmer J, Bridgewater J, Ferreira F, van Ree R, Rabin RL, Vieths S. The history, present and future of allergen standardization in the United States and Europe. *Front Immunol*. 2021;12:725831.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.725831>
13. Gjesing B, Jäger L, Marsh DG, Løwenstein H. The international collaborative study establishing the first international standard for timothy (*Phleum pratense*) grass pollen allergenic extract. *J Allergy Clin Immunol*. 1985;75(2):258–67.
[https://doi.org/10.1016/0091-6749\(85\)90055-7](https://doi.org/10.1016/0091-6749(85)90055-7)
14. Бубенчиков РА, Саканян ЕИ, Зубкова НВ, Добрынин ВП, Горяинов СВ, Хажжар Ф и др. Разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов методом ГЖХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):159–68.
Bubenchikov RA, Sakanyan EI, Zubkova NV, Dobrynin VP, Goriainov SV, Hajjar F, et al. Development and validation of a procedure for the quantitative determination of residual organic solvents in allergen preparations by GC. *Drug Development & Registration*. 2022;11(2):159–68 (In Russ.).
<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-159-168>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.И. Саканян** — организация и координирование этапов исследования, редактирование и переработка текста рукописи; **М.А. Ясная** — анализ и обобщение данных литературы, написание текста рукописи, работа с таблицами и графическим материалом; **В.Ф. Вуль** — координирование этапов исследования, сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; **Р.А. Бубенчиков** — обобщение и интерпретация результатов исследования, редактирование и переработка текста рукописи; **Н.В. Винокурова, Е.С. Юртаева** — анализ и обобщение данных литературы, редактирование и переработка текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Клинические исследования рассмотрены и одобрены на заседаниях Комитета по этике АНО «Научно-исследовательский институт общественного здоровья» (выписка из протокола № 1 от 17.08.2018, выписка из протокола № 1-25/05/18 от 25.05.2018, выписка из протокола № 2-25/05/18 от 25.05.2018). На проведение клинических исследований получены разрешения Минздрава России № 652 от 14.12.2017, № 674–680 от 21.12.2017, № 24–26 от 24.01.2018, № 70, 71 от 20.02.2018, № 73, 76, 77 от 21.02.2018, № 64 от 02.02.2022.

Согласие пациентов. Получено информированное добровольное согласие пациентов на обработку персональных данных и их использование с научной и образовательной целью, в том числе на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.I. Sakanyan** organised and coordinated the study, edited and revised the manuscript. **M.A. Yasnaya** analysed and summarised literature data, drafted the manuscript, and prepared the tabular and graphical material. **V.F. Vul** coordinated the study; collected, analysed, and collated experimental data. **R.A. Bubenchikov** summarised and interpreted the study results, edited and revised the manuscript. **N.V. Vinokurova** and **E.S. Yurtaeva** analysed and summarised literature data, edited and revised the manuscript.

Ethics approval. Clinical trials were reviewed and approved at meetings of the Ethics Committee at the autonomous non-profit organisation National Research Institute of Public Health in 2017–2022 (Excerpts of Minutes No. 1 of 17.08.2018, No. 1-25/05/18 of 25.05.2018, and No. 2-25/05/18 of 25.05.2018). Clinical trials were approved by the Ministry of Health of the Russian Federation (Approvals No. 652 of 14.12.2017; Nos. 674–680 of 21.12.2017; Nos. 24–26 of 24.01.2018; Nos. 70 and 71 of 20.02.2018; Nos. 73, 76, and 77 of 21.02.2018; and No. 64 of 02.02.2022).

Informed consent. The patients gave informed consent for the processing of their protected personal and health information, as well as for its use and anonymised publication for scientific and educational purposes.

Об авторах / Authors

Саканян Елена Ивановна, д-р фарм. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1693-2422>

Ясная Мария Анатольевна, канд. хим. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4486-4834>

Вуль Всеволод Феликсович
v.f.vul@microgen.ru

Бубенчиков Роман Александрович, д-р фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0955-6892>

Винокурова Наталья Владимировна
n.v.vinokurova@microgen.ru

Юртаева Екатерина Сергеевна
e.s.yurtaeva@microgen.ru

Elena I. Sakanyan, Dr. Sci. (Pharm.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1693-2422>

Maria A. Yasnaya, Cand. Sci. (Chem.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4486-4834>

Vsevolod F. Vul
v.f.vul@microgen.ru

Roman A. Bubenchikov, Dr. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0955-6892>

Natalya V. Vinokurova
n.v.vinokurova@microgen.ru

Ekaterina S. Yurtaeva
e.s.yurtaeva@microgen.ru

Поступила 31.07.2023

После доработки 29.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 31 July 2023

Revised 29 August 2023

Accepted 13 September 2023