

Синюгина Александра Александровна

**ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ
ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ
(исследования безопасности и иммуногенности)**

03.02.02 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Ишмухаметов Айдар Айратович

Официальные оппоненты:

Борисевич Сергей Владимирович – кандидат медицинских наук, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, полковник медицинской службы, начальник Федерального государственного бюджетного учреждения «48 центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации

Дедков Владимир Георгиевич – кандидат медицинских наук, заместитель директора Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургской научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Защита диссертации состоится «15» сентября 2021 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 (Д 001.026.02) на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1 и на сайте <http://www.chumakovs.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Колясникова Надежда Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) - вирусный нетрансмиссивный зооноз, широко распространенный в Евразии, а в России занимающий первое место по заболеваемости среди природно-очаговых инфекций.

Отсутствие тенденции к снижению заболеваемости ГЛПС, расширение ареала инфекции, участвовавшие случаи вспышек ГЛПС, ассоциированных с новыми, ранее не известными в России хантавирусами, свидетельствует о возрастающей медицинской и социальной значимости проблемы ГЛПС.

По данным Роспотребнадзора только за период с 2000 по 2019 гг. в России было зарегистрировано 152 588 случаев заболевания ГЛПС, включая более 3,5 тысяч детей в возрасте до 14 лет. Более 600 случаев заболевания закончились летальным исходом. Социально-экономические потери усугубляются ещё и тем, что из числа заболевших ГЛПС до 85% составляют мужчины в возрасте от 20 до 50 лет, то есть, самая трудоспособная часть населения. Этиотропное лечение заболевания отсутствует. Из всего комплекса мер неспецифической профилактики ГЛПС наиболее часто применяемой остается дератизация. Вместе с тем, дератизационные мероприятия обходятся довольно дорого, обеспечивают лишь кратковременное снижение численности грызунов на обработанных территориях и не могут решить проблему ликвидации природного резервуара возбудителя ГЛПС. Наиболее эффективным методом борьбы с ГЛПС является вакцинопрофилактика, что было продемонстрировано на протяжении последних 20 лет в Китае, Южной и Северной Корее. Однако вакцины против ГЛПС, производимые в этих странах на основе вирусов Хантаан и Сеул, не обладают защитным действием против вируса Пуумала – основного возбудителя ГЛПС у жителей Европейской части России, на которую приходится более 98% всей заболеваемости, регистрируемой в России.

В связи с вышеизложенным, одной из наиболее актуальных и приоритетных в настоящее время проблем является разработка вакцинных препаратов против ГЛПС, эффективных для применения в России, отвечающих современным требованиям, предъявляемым к медицинским иммунобиологическим препаратам, вводимым людям.

Накопленный в ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» опыт по изучению вирусозбудителей ГЛПС позволил впервые в мире разработать технологию изготовления и методы контроля поливалентной культуральной, инактивированной, концентрированной, очищенной вакцины против основных возбудителей ГЛПС, вызывающих заболевание людей в европейских и дальневосточных регионах России.

Успешное внедрение в практику здравоохранения новой вакцины против ГЛПС возможно лишь при наличии доказанной в соответствии с современными требованиями высокой степени эффективности и безопасности её применения. Первым этапом исследований в этом направлении

является проведение доклинических испытаний вакцины, что наряду с оптимизацией технологии изготовления вакцины явилось предметом настоящей работы.

Степень разработанности темы исследования

Вскоре после выделения возбудителей ГЛПС, вирусов Хантаан и Сеул, инактивированные вакцины активно начали разрабатываться в Южной и Северной Корее, Китае, Японии (Lee H.W., 1988; Yamanishi K., 1988; Song G., 1992; Cho H. W., 1999). Часть этих разработок были внедрены в производство. Так в Южной Корее с 1990 года выпускается лицензированная моновалентная вакцина Hantavax®. В Китае несколько различных мозговых и культуральных вакцин на основе вирусов Хантаан и Сеул, инактивированных формалином или β-пропиолактоном (β-ПЛ) было произведено и использовано для массовой иммунизации населения. Вакцинация, в дополнение к другим профилактическим мерам, существенно снизила количество случаев ГЛПС в этих регионах. Однако до настоящего времени ни одна из вакцин против ГЛПС не была одобрена для применения в Европе и США. Для профилактики ГЛПС, вызываемой циркулирующими на Европейской территории вирусами Пуумала и Добрава/Белград активно разрабатывались экспериментальные векторные и ДНК-вакцины, но ни одна из них не дошла до стадии производства.

В России были разработаны лабораторные технологии производства экспериментальных инактивированных формалином вакцин на основе размноженных в культуре клеток VERO вирусов, сорбированных на гидроокиси алюминия: двухкомпонентная вакцина (вирусы Пуумала и Куркино) (Ткаченко Е.А. и др., 2009), моновалентная на основе вируса Пуумала (Ткаченко Е.А. и др., 2015), вызывающего более 95% всех случаев ГЛПС в РФ. Доклинические лабораторные испытания этих вакцинных препаратов показали их высокую иммуногенность и безопасность (Бархалёва О.А. и др., 2011). Технологические подходы, использованные при разработке экспериментальных моно и бивалентной вакцин, легли в основу конструирования поливалентной (трёхвалентной) вакцины, актуальность которой объясняется наличием очагов хантавирусной инфекции ассоциированной на Европейской территории с ортохантавирусами *Пуумала* и *Добрава/Белград* (вирус Сочи) и с ортохантавирусом *Хантаан* на Дальнем Востоке. В исследовании впервые представлены данные доклинических испытаний экспериментальной поливалентной вакцины против ГЛПС.

Цель исследования - получение доказательств безопасности и специфической эффективности поливалентной вакцины против ГЛПС (на основе 3-х хантавирусов) в результате проведения доклинических исследований с применением научных методов оценок, соответствующих требованиям и правилам надлежащей лабораторной практики (GLP).

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Разработать применительно к технологии изготовления вакцины против ГЛПС комплекс методов (*in vivo* и *in vitro*) для проведения доклинических исследований на соответствие вакцины требованиям, предъявляемым к медицинским иммунобиологическим препаратам,

вводимым людям.

2. Приготовить опытные образцы (3 лабораторные серии) вакцины против ГЛПС в количестве, достаточном для проведения доклинических исследований.
3. Провести экспериментальные исследования по изучению иммуногенной активности и стабильности вакцины против ГЛПС.
4. Провести испытания общей токсичности (острой, хронической), алергизирующих свойств, иммунотоксичности, мутагенности, репродуктивной токсичности и эмбриотоксичности вакцины против ГЛПС на животных.
5. Разработать соответствующие нормативно-технические документы по изготовлению вакцины против ГЛПС и протоколы её доклинических исследований.

Научная новизна

Впервые в результате экспериментальных исследований удалось научно обосновать биотехнологические подходы для создания и проведения доклинических исследований инактивированной кандидатной поливалентной (на основе трех хантавирусов) вакцины против ГЛПС, не имеющей аналогов в мире. Впервые показано, что трехвалентная кандидатная вакцина в равной степени индуцирует иммунный ответ по отношению к составляющим её вирусам – возбудителям ГЛПС. Впервые проведены токсикологические исследования на трех видах животных, показавшие отсутствие токсичности (острой, хронической), алергизирующих свойств, иммунотоксичности, мутагенности, репродуктивной токсичности и эмбриотоксичности поливалентной вакцины.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Разработана технология изготовления поливалентной кандидатной вакцины против ГЛПС, адаптированной к эпидемиологическим условиям РФ, то есть, с использованием наиболее патогенных и эпидемиологически значимых хантавирусных штаммов. Все методические подходы, в соответствии с полученными результатами, могут быть использованы для освоения промышленного производства вакцины ГЛПС-Вак. Универсальность вакцины позволяет рассматривать её в качестве наиболее перспективного вакцинного препарата для специфической профилактики ГЛПС как в России, так и в других европейских и азиатских странах.
2. Разработаны соответствующие нормативно-технические документы, включая проекты опытно-промышленного регламента, фармакопейной статьи предприятия, инструкции по применению вакцины, брошюры исследователя и протокола клинического исследования.
3. Результаты проведения комплексного доклинического испытания вакцины ГЛПС-Вак с применением научных методов оценок, соответствующих требованиям и правилам надлежащей лабораторной практики (GLP), могут являться основанием для проведения I-й

фазы клинических испытаний.

4. Получен патент на изобретение за № 2683508 от 28.03.2019 г. «Штамм вируса для изготовления вакцинных препаратов против геморрагической лихорадки с почечным синдромом (варианты)». В Евразийское патентное ведомство подана заявка о выдаче патента на изобретение: «Технология получения вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом». Зарегистрирована 10.10.2018 г. под № 201800511.

Методология и методы исследования

В исследованиях, проведенных в рамках настоящей диссертационной работы, применяли комплекс современных лабораторных методов (включая вирусологические, иммунологические и молекулярно-генетические).

Объем доклинических исследований определяли в соответствии с нормативно-регламентирующими документами (Руководство по проведению доклинических исследований в 2-х частях, под редакцией А.Н.Миронова, 2012).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Оптимизированы биотехнологические этапы производства трёхвалентной вакцины против ГЛПС и разработан комплекс методов (*in vivo* и *in vitro*) для проведения доклинических исследований на соответствие вакцины требованиям, предъявляемым к медицинским иммунобиологическим препаратам, вводимым людям.
2. Приготовлены 3 лабораторные серии вакцины в количестве, достаточном для проведения доклинических исследований.
3. Состояние животных в экспериментах по определению острой и хронической (субхронической) токсичности свидетельствует о хорошей переносимости и безвредности вакцины в дозах, значительно превышающих вакцинирующие дозы для человека.
4. Показано отсутствие иммунотоксического влияния вакцины на В-клеточный и Т-клеточный иммунитет в экспериментах по определению титра гемагглютинина в сыворотке крови мышей и в реакции гиперчувствительности замедленного типа к эритроцитам барана на фоне иммунизации эритроцитами барана.
5. Установлено отсутствие проявлений алергизации, вызванных введением вакцины в экспериментах на половозрелых и неполовозрелых морских свинках.
6. Вакцина не нарушает репродуктивную функцию экспериментальных животных и не оказывает эмбриотоксического воздействия при длительном введении самцам и самкам крыс.
7. Вакцина не проявляет мутагенных свойств по результатам проведения теста Эймса.
8. Вакцина против ГЛПС полностью соответствует проекту спецификации по контролируемым параметрам через 2 года 8 мес хранения в регламентируемых условиях.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных в ходе работы данных определяется достаточным числом исследований, длительным сроком наблюдений, комплексным подходом к проведению исследований, выполненным с использованием современных методов и статистической обработкой полученных результатов. Все выводы и практические рекомендации диссертации логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам работы.

Личное участие автора

Личный вклад автора заключается в планировании и организации проведения исследований по разделам диссертации, подготовке основных публикаций, формулировании выводов и основных положений диссертации. Имена всех соавторов указаны в опубликованных работах. Участие соавторов отражено в тексте диссертации и автореферата. Автор являлся исполнителем гранта №2018-14.N08.11.0102-3-001 Государственного контракта на тему: «Доклинические исследования поливалентной инактивированной вакцины против хантавирусных лихорадок на основе не менее трёх хантавирусов – возбудителей», в рамках которого выполнены разделы, касающиеся доклинических исследований вакцины против ГЛПС.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 03.02.02 – «вирусология». Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 2, 7, 10 паспорта специальности «вирусология».

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2019), Региональной научно-практической конференции Приволжского федерального округа «Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: эпидемиология, профилактика и диагностика на современном этапе» (Казань, 2019), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 2019), 11-й международной конференции по хантавирусам (Лёвен, Бельгия, 2019), Ежегодном конгрессе международного вакцинного общества (Гент, Бельгия, 2019).

Структура и объём диссертации.

Диссертационная работа изложена на 125 страницах и состоит из введения и 4-х глав основной части диссертации, включая: обзор литературы, материалы и методы, основные технологические этапы изготовления вакцины ГЛПС-Вак, результаты доклинических исследований вакцины ГЛПС-Вак, а также заключение, выводы, список сокращений, список литературы, содержащий 105 источников. Работа иллюстрирована 84 таблицами и 4 рисунками.

Публикации

Основные результаты работы полностью отражены в печати. По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них в журналах ВАК – 4; публикации, индексируемые в системе РИНЦ - 12, включая 5 тезисов; индексируемые в системе Web of Science - 2 статьи; тезисы, опубликованные за рубежом – 3. По теме диссертации получен 1 патент на изобретение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

1. Изготовление вакцины

Производственная культура клеток. Использование линии клеток VERO для производства инактивированной вакцины ГЛПС стало возможным в результате успешной адаптации первично выделенных штаммов 3-х хантавирусов к размножению в клетках VERO в условиях отсутствия сыворотки крови животных в среде поддержки роста клеток. Для выращивания рабочих посевных вирусов Пуумала, Хантаан, Сочи использовали производственную культуру клеток линии VERO, полученную из клеточной взвеси рабочего банка клеток VERO (РБК VERO).

Производственные штаммы вирусов. Для изготовления вакцины ГЛПС-Вак использовали штаммы 3-х хантавирусов:

- штамм ТКД/Уфа-97 вируса Пуумала выделен из лёгочной ткани погибшего от ГЛПС больного в Башкирии;
- штамм Р-88/Хабаровск-89 вируса Хантаан выделен из крови больного тяжелой формой ГЛПС в Хабаровском крае;
- штамм Орлова/Сочи-09 вируса Сочи (подтип вируса Добрава/Белград) выделен из крови больной, погибшей от ГЛПС в Краснодарском крае.

После адаптирования к культуре клеток VERO выше перечисленные штаммы получили название вакцинных штаммов:

- штамм ПУУ-ТКД/Vero (вирус Пуумала), депонирован в ГКВ, № 1026, 2009 г.;
- штамм ХТН-Р88/Vero (вирус Хантаан), депонирован в ГКВ, № 1283, 2018 г.;
- штамм ДОБ-Сочи/Vero (вирус Сочи), депонирован в ГКВ, № 1282, 2018 г.

Вакцинные штаммы ПУУ-ТКД/Vero, ХТН-Р88/Vero и ДОБ-Сочи/Vero обладают видовой специфичностью, способностью размножаться в чувствительных к хантавирусам культурах клеток VERO и VERO-E6, к которым эти штаммы адаптированы, с достаточным накоплением иммунологически активного материала.

Видовая специфичность штаммов вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи была установлена в опытах нейтрализации в культуре Vero E6 с помощью перекрёстного титрования с иммунными сыворотками.

На вакцинные штаммы получены патенты, полногеномные сиквенсы вакцинных штаммов

зарегистрированы в GenBank под номерами: PUU-TKD/VERO: S – MH251331, M – MH251332, L – MH251333; HTN-P88/VERO: S – MH251328, M – MH251329, L – MH251330; DOB-SOCHI/VERO: S – MH251334, M – MH251335, L – MH251336.

Производственные штаммы получены в результате пассирования (1-3 пассажа) вакцинных штаммов в культуре клеток VERO. Производственные штаммы ПУУ-ТКД/Vero, ХТН-Р88/Vero и ДОБ-Сочи/Vero, аттестованные в соответствии с международными требованиями, явились исходными для приготовления штаммового, маточного и посевного запасов вирусов, хранение которых осуществляли в ампулах (типа Cryotube) при температуре минус $(190\pm 2)^{\circ}\text{C}$ в Дьюаре с жидким азотом.

Методы контроля

Методы контроля, регламентируемые Государственной Фармакопеей, представлены в Таблице 1

Таблица 1 - Методы контроля, регламентируемые Государственной Фармакопеей

Виды контроля	Регламентирующий документ
1. Стерильность	ГФ XIII. ОФС «Стерильность»
2. Контроль на отсутствие посторонних агентов	ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0006.15
3. Белок по Лоури	ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0023.15
4. Содержание БСА	ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0020.1
5. Бактериальные эндотоксины	ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0006.15
6. Содержание алюминия	ГФ XIII, ОФС.1.2.2.2.0001.15
7. Пирогенность	ГФ XIII ОФС.1.2.4.0005.15
8. pH	ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0004.15
9. Формальдегид	ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0024.15

Специфические методы, разработанные для контроля хантавирусных вакцин:

- Метод определения инфекционной активности вируса применяли для индикации и титрования вируса по выявлению фокусобразующих единиц (ФОЕ), основанный на постулате - 1 ФОЕ соответствует одной вирусной частице.
- Типоспецифичность вирусных штаммов определяли в реакции нейтрализации по редукции ФОЕ. Достоверным иммунологическим отличием штаммов является 4-х кратная и более разница в титрах контрольных сывороток в перекрестных опытах нейтрализации с прототипными штаммами хантавирусов.
- Специфическая активность (иммуногенность) определяется по выявлению специфического иммунного ответа на введение мышам линии BALB/c вакцины ГЛПС-Вак (продукция нейтрализующих антител к хантавирусам Пуумала, Хантаан и Сочи).
- Контроль специфической безопасности (отсутствие живого хантавируса) осуществляется по ранее разработанной методике (Бархалёва О.А. и др., 2011).

- Контроль специфической активности проводили иммуноферментным методом по контролю содержания N белка (Дзагурова Т.К. и др., 2013).
- Контроль полноты сорбции на гидроокиси алюминия проводили по контролю содержания N белка с использованием иммуноферментного метода (Дзагурова Т.К. и др., 2013).

2. Доклинические исследования

Для проведения доклинических исследований поливалентной вакцины против ГЛПС (иммуногенность и стабильность, острая и хроническая токсичность, аллергизирующие и иммунотоксические свойства, эмбриотоксическое воздействие, влияние вакцины на репродуктивную функцию, мутагенные свойства вакцины) использовали материалы и методы в строгом соответствии с требованиями официальных регламентирующих документов.

3. Методы статистической обработки результатов исследований

Статистический анализ результатов токсикологических исследований вакцины выполнен с помощью программы Statistica 6.0. Уровень статистической значимости различий между выборками оценивали с помощью критериев Манна Уитни. Полученные результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднегеометрическое значение титра нейтрализующих антител, m – стандартная ошибка среднего. Достоверность различий выборочных совокупностей оценивались по критериям Стьюдента-Фишера и Вилкоксона. Достоверность их корреляции определялась по коэффициенту корреляции. Результаты исследования иммуногенной стабильности вакцины были проанализированы в программе GraphPad Prism версии 8.2.0. Статистическую значимость определяли с использованием одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюка. Статистическая значимость указывается как ns = незначительно, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

1 Основные технологические этапы изготовления вакцины ГЛПС-Вак

Этапы производства. Схемы основных этапов производства вакцины ГЛПС-Вак представлены на Рисунках 1 и 2.

Накопление вирусосодержащего материала. Для заражения использовали посевной вирус или после одно- или двукратного пассирования в культуре клеток VERO. Множественность заражения клеток составляла для каждого вируса 0,02-0,1 ФОЕ/кл. В расчете на пятьдесят 1 литровых роллеров готовили клеточную взвесь в объеме 400 мл, содержащую 9×10^8 клеток в мл.

Посевной вирус оттаивали при температуре $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$, разводили средой Игла ИМЕМ2 с 5 % сыворотки теленка в объеме 100 мл до концентрации от 3 до 5 на 10^7 ФОЕ/мл. Объединяли 400 мл клеточной взвеси со 100 мл посевного вируса.

Полученную вирус-клеточную взвесь инкубировали при температуре $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ на шейкере в течение 1 часа. Вирус-клеточный субстрат разливали по 10 мл в 1л роллерные бутылки, в которые

предварительно внесли по 80 мл ростовой среды (ИМЕМ2 с 5 % сыворотки теленка). На 3 день инкубирования при $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ делали смену среды на поддерживающую (Игла МЕМ). С 5 по 9 сутки делали ежедневные сливы культуральной жидкости с последующим внесением 50 мл на роллерную бутылку свежей среды ИМЕМ. Сведение партий вирусосодержащей культуральной жидкости (отдельно для вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи) проводили на 5,6,7,8,9 сутки одной или нескольких закладок клеток-продуцентов.

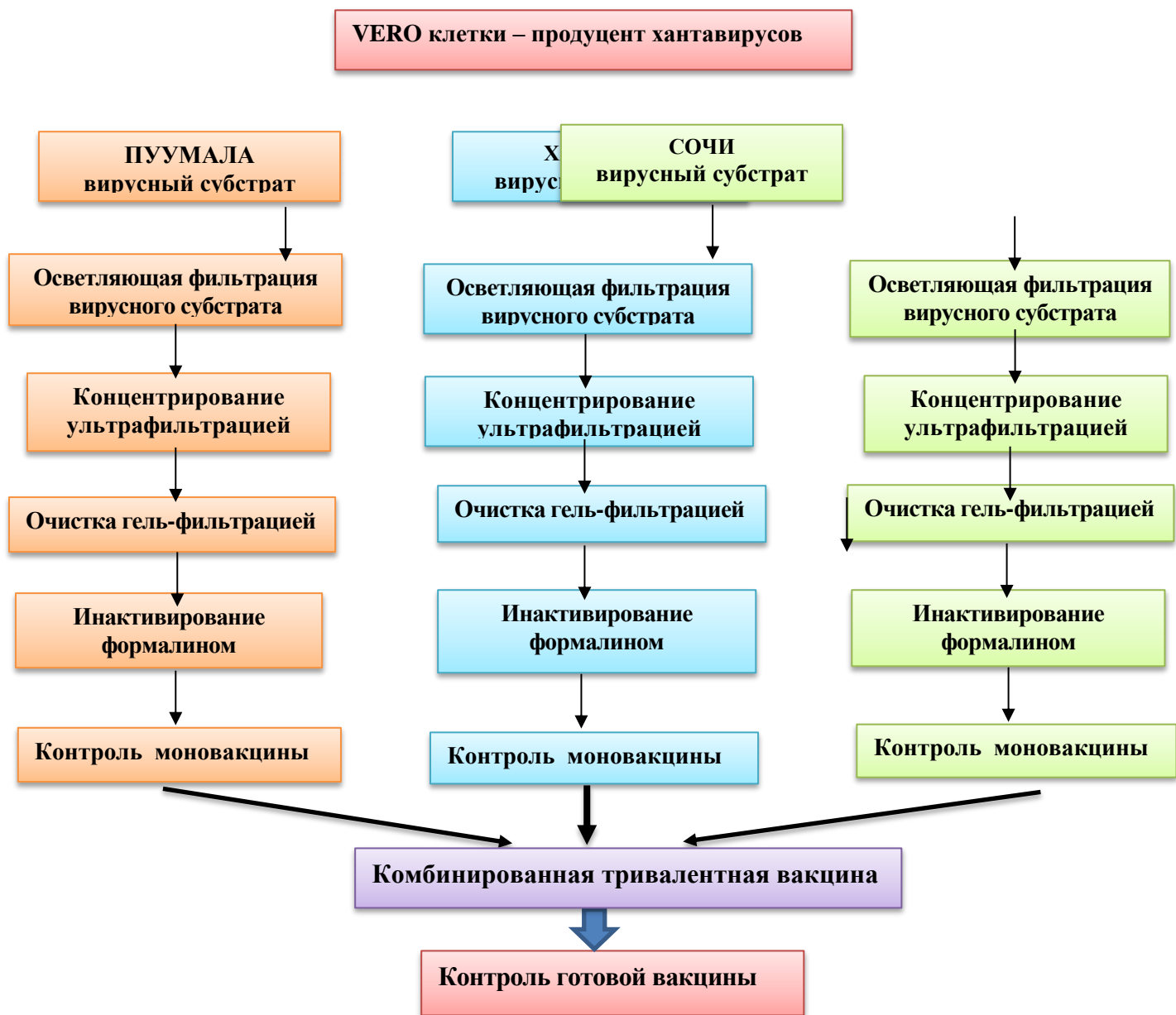


Рисунок 1 – Основные этапы изготовления вакцины ГЛПС-Вак.

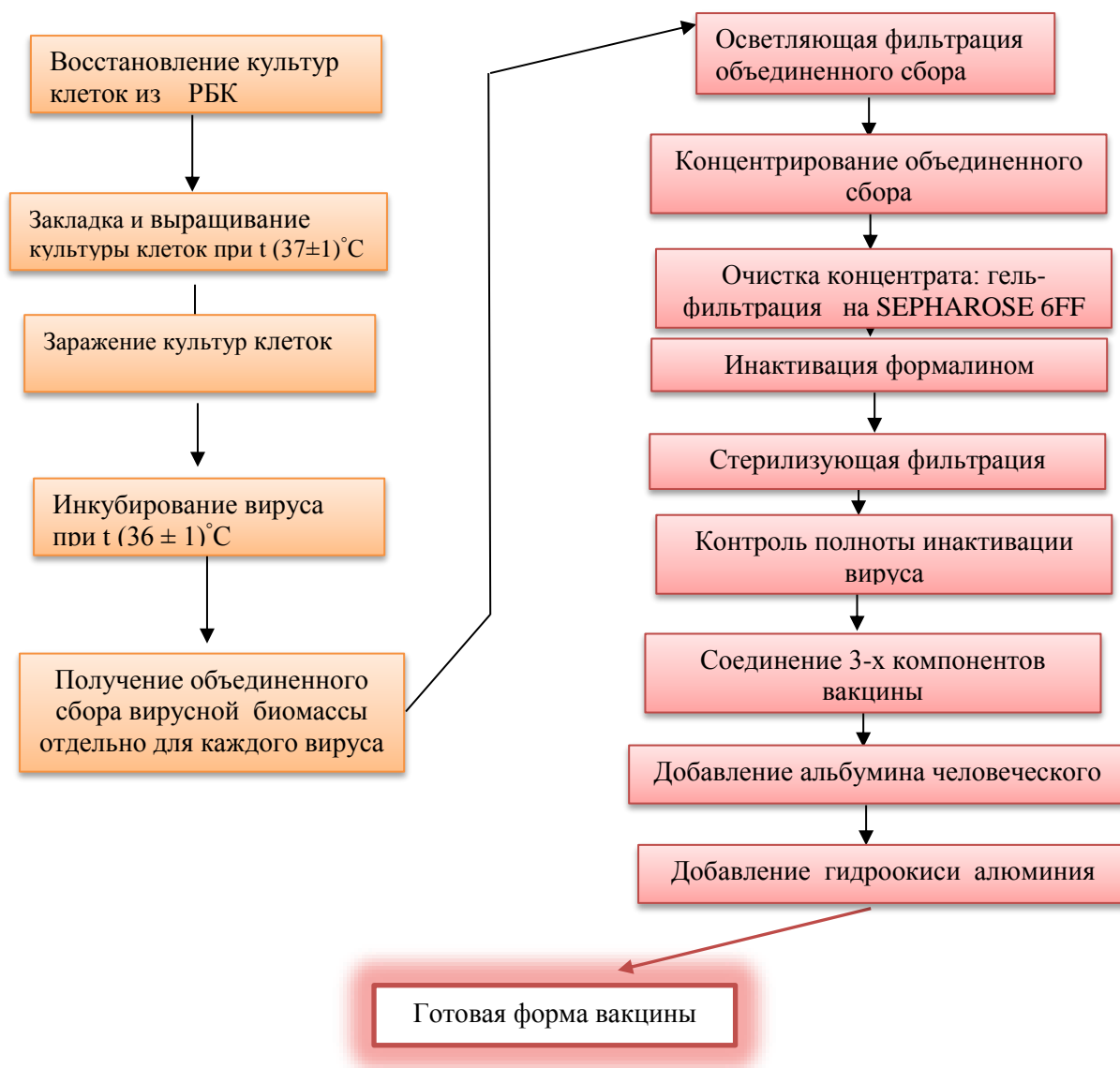


Рисунок 2 – Биологическая схема производства вакцины ГЛПС-Вак.

Использовали только вирусосодержащие культуральные жидкости, в которых инфекционный титр вируса составлял не менее 5,0 lg ФОЕ/мл, свободные от бактериальной и грибковой контаминации и микоплазм. Перед объединением партии вирусосодержащей культуральной жидкости размораживали путем выдерживания при температуре (18 ± 2) °С. Материал асептично переливали в одну ёмкость для каждого вируса в отдельности. Отбирали пробы на контроль инфекционной активности (титр вируса).

Концентрирование вирусосодержащей культуральной жидкости. Концентрирование проводили путем ультрафильтрации в тангенциальном потоке, используя систему концентрирования с пределом отсечения 100 кДа и площадью фильтрации от 0,1 до 0,5 м². Ультрафильтрацию проводили при температуре 20-24 °С и давлении до 2,5 бар. Для предупреждения значительного повышения температуры полуфабриката последний предварительно охлаждали до температуры 6 ± 2 °С.

Очистка первичных концентратов вирусов. Для гель-фильтрации использовали колонку с Sepharose 6 Fast Flow производства GE Healthcare, которую уравнивали трис-буфером (10 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl; pH 7,2 – 7,4). Затем наносили образец (концентрат) объемом 15 - 20 мл. Элюировали тем же буфером со скоростью 4 - 6 мл/мин, собирали фракции объемом 10 мл. Оптическую плотность (ОП) каждой фракции определяли при длине волны 280 нм. Хранили концентрат при температуре: (6 ± 2) °C не более 5 дней, при температуре минус (18 ± 2) °C - не более 1 месяца, при температуре минус (70 ± 2) °C – до 1 года.

Инактивирование и контроль на отсутствие живого вируса (специфическая безопасность) моновалентных вакцин против ГЛПС. Очищенный вирус в виде вирусосодержащей жидкости (пул фракций после хроматографической очистки, каждый хантавирус в отдельности) подвергали инактивированию формалином. Вирусосодержащую жидкость после добавления формалина подвергали стерилизующей фильтрации через мембрану Millipore с диаметром пор 0,22 мкм. Процесс инактивации длился 30 дней при температуре 6 ± 2 °C. На 30-й день процесс инактивации останавливали: нейтрализовали формальдегид добавлением сульфита натрия (Na_2SO_3) до конечной концентрации 0,0264 М/л. По окончании срока инактивации из каждой бутылки забирали пробы для контроля на специфическую безвредность.

Получение готовой формы вакцины ГЛПС-Вак. Полуфабрикат серии трехвалентной вакцины против ГЛПС получали после сведения равных объемов полуфабрикатов моновалентных вакцин Пуумала, Хантаан и Сочи в разведениях, содержащих N антиген в титре не менее 1/128 для каждой из моновакцин. В соответствии с описанной технологией были приготовлены 3 экспериментальные серии вакцины ГЛПС-Вак по 600, 650 и 660 доз соответственно. Основные характеристики экспериментальных серий вакцины представлены в Таблице 10.

Для оценки иммуногенности готовую адсорбированную комбинированную вакцину вводили не менее чем 8 мышам линии BALB/c 9-10 недельного возраста, весом 18-20 г внутримышечно 3-хкратно с 2-х недельным интервалом, используя для одной иммунизации 1 РД готовой вакцины. В качестве контрольных использовали мышей BALB/c, которым в те же сроки вводили адсорбент – гидроксид алюминия. Через 2 недели после последней инъекции у животных брали кровь из орбитальной вены и готовили из неё сыворотку. В полученных сыворотках крови определяли титр вируснейтрализующих антител к вирусам Пуумала, Хантаан и Сочи.

2 Результаты токсикологических исследований вакцины ГЛПС-Вак

Результаты исследования острой токсичности. Перечень исследований острой токсичности вакцины включал следующие разделы: влияние кратного внутримышечного введения вакцины на общее состояние и поведенческие реакции половозрелых и неполовозрелых мышей; поведение мышей в «открытом поле»; эмоциональная реактивность животных в тесте «приподнятый

крестообразный лабиринт»; клиническая характеристика интоксикации; оценка состояния животных на внутривенное и внутримышечное введение вакцины; результаты некропсии.

Таблица 10 - Исследования экспериментальных серий вакцины ГЛПС-Вак на соответствие требованиям, предъявляемым к инактивированным вакцинам, вводимым людям*

Показатели	Требования ГФ и проекта НТД	Серия 1	Серия 2	Серия 3
Описание	Непрозрачная суспензия	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Иммуногенная активность	Титр нейтрализующих АТ к хантавирусам в иммунных сыворотках BALB/c $\geq 1:20$	Пуумала – 1:512 Хантаан – 1:480 Сочи – 1:440	Пуумала – 1:520 Хантаан – 1:480 Сочи – 1:450	Пуумала – 1:480 Хантаан – 1:465 Сочи – 1:440
Специфическая активность	Титр N антигена не менее 1/256	Соответствует	Соответствует	Соответствует
pH	от 7,0 до 7,6	7,6	7,6	7,6
Бактериальные эндотоксины	Не более 25 ЕЭ	Менее 25 ЕЭ	Менее 25 ЕЭ	Менее 25 ЕЭ
Пирогенность	Должна быть апиrogenна	Апиrogenна	Апиrogenна	Апиrogenна
Аномальная токсичность	Должна быть не токсична	Не токсична	Не токсична	Не токсична
Стерильность	Должна быть стерильна	Стерильна	Стерильна	Стерильна
Микоплазмы	Не должна содержать микоплазм	Не содержит	Не содержит	Не содержит
Формальдегид	Не более 0,01 мг/дозу	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Алюминий	От 1,0 до 1,5 мг/дозу	1,1 мг/дозу	1,15 мг/доза	1,11 мг/доза
Специфическая безопасность	Не должна содержать живого вируса	Не содержит	Не содержит	Не содержит
БСА	Не более 0,5 мкг/доза	< 0,5 мкг/доза	< 0,5 мкг/доза	< 0,5 мкг/доза
Белок	Не более 125 мкг/доза	85 мкг/доза	70 мкг/доза	78 мкг/доза
Остаточная ДНК клеток	Не более 10 нг/доза	< 10 нг/доза	< 10 нг/доза	< 10 нг/доза
Полнота сорбции	От 80 до 100%	99 %	99 %	99 %

* Экспериментальные серии поливалентной вакцины приготовлены и проконтролированы совместно с научными сотрудниками лаборатории геморрагических лихорадок С.С. Курашовой, к.б.н. М.В.Баловневой, к.б.н. М.С. Егоровой, Н.А. Коротинной.

Проведенные экспериментальные исследования острой токсичности на аутбредных мышах и морских свинках показали, что вакцина в условиях внутримышечного применения максимальных доз не оказывает токсического действия на организм лабораторных животных. При исследовании острой токсичности вакцины на аутбредных половозрелых и неполовозрелых мышах значения ЛД₅₀

установить не удалось, в связи с отсутствием гибели экспериментальных животных. Максимальная доза вакцины при внутримышечном введении составила 1,5 дозы на половозрелую мышь и 5 доз на морскую свинку и была ограничена предельно возможными объемами введения для данного вида животных. Клиническая картина интоксикации при применении исследуемой вакцины была выражена неярко, наблюдалось незначительное угнетение общего состояния, при внутримышечном введении – хромота, гиподинамия. Причем, все указанное, в основном, было характерно как для животных, получавших вакцину, так и для тех, которые получили физиологический раствор. Наблюдаемые побочные эффекты исчезали в течение 2-х часов от момента введения препаратов.

Ежедневное наблюдение за общим состоянием животных, поведенческими реакциями в руках и на открытой площадке, а также изучение индивидуального поведения показали, что введение вакцины не оказывало отсроченного влияния на общее состояние, ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональный статус экспериментальных животных.

Вскрытие животных спустя 14 дней после острого введения вакцины не показало наличия каких-либо остаточных явлений, связанных с перенесенной интоксикацией. По результатам патоморфологических исследований внутримышечное введение вакцины в максимальных дозах не вызывало развития дистрофических, деструктивных, очаговых склеротических изменений в паренхиматозных клетках и строме внутренних органов.

Таким образом, вакцина не обладала токсическим и местно-раздражающим действием при введении лабораторным животным.

Результаты исследования хронической токсичности. Целью исследования хронической токсичности вакцины являлось: изучение влияния многократного (21 дневного) введения вакцины на массу тела; на общее состояние и поведенческие реакции половозрелых и неполовозрелых мышей (поведение мышей в тесте «открытое поле», в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»); влияния вакцины на биохимические показатели крови, а также патоморфологические и гистологические изменения в ответ на введение вакцины.

В результате проведенных исследований по выявлению хронической токсичности вакцины на аутбредных мышах и морских свинках было показано, что вакцина в условиях многократного пролонгированного внутримышечного 21 дневного введения не оказывала токсического действия на организм лабораторных животных. Динамика массы тела контрольных и экспериментальных животных была положительной на протяжении всего исследования. Наблюдалось незначительное отставание в росте половозрелых и неполовозрелых морских свинок, получавших препараты в максимальном объеме – 0,5 дозы, при отмене препаратов динамика массы тела восстанавливалась. Признаков интоксикации не было выявлено. Снижение активности животных после 21 дневного применения вакцины было незначительным и

обратимым. Ежедневное наблюдение во время изучения хронической токсичности за общим состоянием животных, поведенческими реакциями в руках и на открытой площадке, а также изучение индивидуального поведения показали, что внутримышечное введение 2-х доз вакцины не влияло на общее состояние, ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональный статус мышей. Гематологические и биохимические показатели у половозрелых морских свинок при длительном внутримышечном и внутривенном введении вакцины (для внутривенного введения использовали вакцинный препарат, не сорбированный на гидроокись алюминия) оставались в пределах физиологической нормы. При патоморфологическом исследовании внутренних органов половозрелых и неполовозрелых морских свинок, и беспородных белых мышей, которым вводили вакцину и физиологический раствор (контроль) не вызывало раздражения, воспаления или деструкции тканей в месте введения; не вызывало макроскопических изменений головного мозга, внутренних и эндокринных органов, гиперводемического отека внутренних органов, что подтверждается величинами их массовых коэффициентов. Слабовыраженное местно-раздражающее действие при многократном внутримышечном введении наблюдалось у некоторых животных как из опытной, так и из контрольной групп, что может быть обусловлено длительной травматизацией в месте инъекции. В результате гистологического исследования было показано, что пролонгированное введение вакцины мышам и морским свинкам не сопровождалось развитием дистрофических, деструктивных, очаговых склеротических изменений в паренхиматозных клетках и строме внутренних органов.

Результаты исследования алергизирующих свойств. Для определения алергизирующих свойств вакцины использовали тест «реакция общей анафилаксии» у половозрелых и неполовозрелых животных, а также тест «конъюнктивальная проба» у половозрелых животных.

При постановке теста «реакция общей анафилаксии» у несенсибилизированных и сенсибилизированных морских свинок после введения разрешающей дозы вакцины признаков анафилактической реакции по индексу Weigle, практически, не было выявлено. Лишь только в одном случае среди сенсибилизированных животных были отмечены признаки слабой алергической реакции (беспокойство, учащение дыхания, почесывание мордочки и произвольное мочеиспускание), которые в течение 30 минут исчезли. Выявленная слабая реакция у одного животного позволяет заключить о возможной способности вакцины к сенсибилизации организма при индивидуальной чувствительности.

При постановке теста «конъюнктивальная проба» после введения животным разрешающей дозы вакцины не было выявлено развития алергического конъюнктивита при оценке через 15 минут (немедленный тип), а также через 24 и 48 часов (замедленный тип).

Результаты исследования иммунотоксичности. Целью исследования было установление иммунотоксических свойств вакцины при введении половозрелым и неполовозрелым мышам. Для определения антител использовали реакцию гемагглютинации эритроцитов барана. Иммунотоксическое воздействие вакцины на Т-клеточный иммунитет *in vivo* оценивали по реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей к эритроцитам барана. Сравнение индексов воспаления в тесте определения гиперчувствительности замедленного типа к эритроцитам барана показало, что вакцина не обладала ни стимулирующим, ни ингибирующим воздействием на иммунную реакцию как половозрелых, так и неполовозрелых мышей. Введение вакцины в дозе 0,5 и 1,0 мл не оказывало угнетающего влияния на антителогенез; титр гемагглютининов был незначительно выше в сыворотках крови половозрелых мышей испытываемой группы по сравнению с контрольной группой (разница 0,51 log₂), а значение индекса реакции составляло 1,07. В испытываемой группе неполовозрелых мышей также отмечалась некоторая тенденция к увеличению общего титра антител в сыворотках крови мышей, иммунизированных вакциной, однако значение индекса реакции (1,18) не превышало порог, указывающий на стимулирующий эффект.

Результаты изучения эмбриотоксического действия. Исследование эмбриотоксического действия вакцины на репродуктивную систему половозрелых белых крыс, а также антенатального повреждающего действия в постнатальном периоде на развитие эмбрионов крыс показало отсутствие токсического воздействия на репродуктивные органы животных, на развитие эмбрионов и на потомство, родившееся от самок, получавших вакцину в течение 20 дней беременности, в независимости от путей её введения. Внутримышечное введение самкам крыс вакцины в одной и трех прививочных дозах с 1 по 19 день беременности не оказывало эмбриотоксического действия: показатели эмбрионального развития в опытных группах не имели статистически значимых отклонений от показателей в группе контроля; физическое развитие, скорость развития сенсорно-двигательных функций и эмоционально-двигательная активность потомства опытных и получавших вакцины крыс также не выявило наличия отклонений от нормы.

Результаты исследования влияния на репродуктивную функцию животных. В период введения вакцин снижения темпов прироста массы тела, изменений в поведении, гибели животных не отмечалось ни в одной из изучаемых групп самцов или самок. Индекс беременности достоверно не отличался в изучаемых группах. При вскрытии самок не было выявлено повышения уровней пред- и постимплантационной смертности в подопытных группах по сравнению с соответствующими контрольными группами. У оставленных рожать самок, каких-либо особенностей в протекании родов и заботе о потомстве не отмечено. Уровни гибели новорожденных крысят, соотношение самцов и самок в помете не различались в изучаемых

группах. Сроки отлипания ушной раковины, появления первичного волосяного покрова, прорезывания резцов были синхронны в пометах подопытной и контрольной. Открытие глаз у потомства самцов и самок, получавших вакцину, произошло практически в те же сроки, как и в контрольной группе. Опускание семенников и открытие влагалища по срокам также не отличались в изучаемых группах.

Анализ полученных данных показал, что длительное внутримышечное введение вакцины в прививочной для человека дозе не оказывает воздействия на репродуктивную функцию самцов и самок крыс.

Результаты исследования мутагенных свойств в тесте Эймса. Установление мутагенных свойств вакцины было проведено в тесте Эймса в микропланшетном формате (Ames MPF™ 98/100/1535/1537, Xenometrix, Швейцария).

В качестве индикаторных микроорганизмов были использованы бактериальные штаммы *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, в геном которых внесены мутации по типу замены пар оснований и сдвига рамки считывания. В результате мутаций у бактериальных штаммов была потеряна способность к росту на безгистидиновой среде. Воздействие потенциальных мутагенов могло привести к индукции обратных мутаций и способности к росту на среде, не содержащей гистидин.

В качестве негативного контроля применяли стерильную воду для инъекций. Для тестируемых препаратов количество *His*⁺-ревертантов в секциях с негативным контролем в варианте без метаболической активации S9 и в системе с метаболической активацией S9 не превышало максимально допустимые значения (≤ 8 для штаммов TA98, TA1535, TA1537 и ≤ 12 для штамма TA100).

В качестве позитивного контроля были использованы стандартные мутагены в соответствии с рекомендациями OECD 471. В варианте без метаболической активации микросомальной фракцией S9 применяли 2-нитрофлуорен (2мкг/мл; штамм TA98), N-оксид-4-нитрохиолин (0,1 мкг/мл; штамм TA100), N4-аминоцитидин (100 мкг/мл; штамм TA1535), 9-аминоакридин (15 мкг/мл; штамм TA1537). В варианте с метаболической активацией микросомальной фракцией печени крыс был использован стандартный мутаген 2-аминоантрацен (5 мкг/мл) для всех штаммов. Количество мутантных колоний в секциях с позитивным контролем превышало минимально допустимое значение (≥ 25 колоний позитивного контроля) в варианте без метаболической активации S9 и в варианте с метаболической активацией S9. При тестировании вакцины в варианте без активации микросомальной фракцией печени и в присутствии фракции S9 не было выявлено мутагенных свойств на штаммах TA98, TA100, TA1535, TA1537 в разведениях препарата 1 – 0,00001 дозы.

Полученные результаты теста Эймса свидетельствуют об отсутствии мутагенных свойств

вакцины ГЛПС-Вак.

3 Результаты исследования иммуногенности и стабильности вакцины ГЛПС-Вак

Для исследования иммуногенной активности готовой вакцины на разных сроках её хранения в регламентированных условиях (6, 12 и 24 месяцев) иммунизировали мышей BALB/c с последующим определением в сыворотках крови животных нейтрализующих антител к хантавирусам Пуумала (ПУУ), Хантаан (ХТН) и Сочи (СОЧИ) (Таблица 1, Рисунок 3). Эксперименты по выявлению нейтрализующих антител выполнены совместно с научными сотрудниками лаборатории геморрагических лихорадок С.С. Курашовой и к.б.н. М.С. Егоровой.

Таблица 1 - Нейтрализующие антитела в сыворотках крови мышей BALB/c после иммунизации вакциной с разными сроками хранения

Разведение вакцины	Вирусы	Сроки хранения вакцины							
		0		6 месяцев		12 месяцев		24 месяца	
		Средне арифм. титр	Средне геометр. титр	Средне арифм. титр	Средне геометр. титр	Средне арифм. титр	Средне геометр. титр	Средне арифм. титр	Средне геометр. титр
н/р	ПУУ	-	-	-	-	544±48,8	9,1±0,1	140±14,4	7,1±0,2
	ХТН	-	-	-	-	512±52,2	8,9±0,5	80±15,4	6,3±0,3
	СОЧИ	-	-	-	-	480±53,3	8,8±0,2	68±12,6	6,1±0,2
1/2	ПУУ	584±38,6*	9,2±0,4^	576±56,8	9,1±0,3	304±44,3	8,1±0,2	60±14	5,9±0,3
	ХТН	540±68,6	9,1±0,4	546±45,8	9,1±0,1	240±26,7	7,8±0,2	40±14,4	5,3±0,3
	СОЧИ	488±46,4	8,9±0,6	512±52,2	8,9±0,2	224±26,1	7,7±0,2	30±6,5	4,9±0,2
1/8	ПУУ	128±13,1	6,9±0,2	118±13,1	7,3±0,2	128±13,1	6,3±0,5	44±8,9	5,5±0,2
	ХТН	192±36,1	7,3±0,3	240±26,7	6,8±0,2	112±13	6,7±0,2	40±14,4	4,8±0,2
	СОЧИ	112±13,1	6,7±0,2	128±13,1	6,9±0,2	104±12,2	6,6±0,1	28±5,5	4,8±0,3
1/32	ПУУ	26,6±4,2	4,7±0,2	16±3,4	4,5±0,2	24±4,4	4,6±0,2	<20	<4,3
	ХТН	22,8±3,1	4,5±0,1	20±3,4	4,6±0,2	23±4	4,5±0,2	<20	<4,3
	СОЧИ	26,6±3,6	4,6±0,2	26±5,4	4,8±0,2	23±3,33	4,5±0,2	<20	<4,3

*среднеарифметический титр антител ± стандартная ошибка

^среднегеометрический титр антител, выраженный в \log_2 ± стандартная ошибка

По результатам выявления нейтрализующих антител к вирусам Пуумала, Хантаан и Сочи можно сделать заключение о том, что вакцина через 6 и 12 месяцев хранения в регламентируемых условиях сохраняла исходный уровень иммуногенности. Через 2 года хранения отмечено снижение титров нейтрализующих антител, тем не менее, вакцина до разведения 1/8 включительно индуцирует выработку нейтрализующих антител в титре более, чем 1/20.

Исследование стабильности вакцины по неспецифическим показателям не выявило отклонений от нормы, т.е. по физико-химическим параметрам, стерильности, отсутствию пирогенности и аномальной токсичности вакцина после 2-х лет хранения полностью соответствовала требованиям регламентирующих документов на вакцинные препараты, вводимые людям.

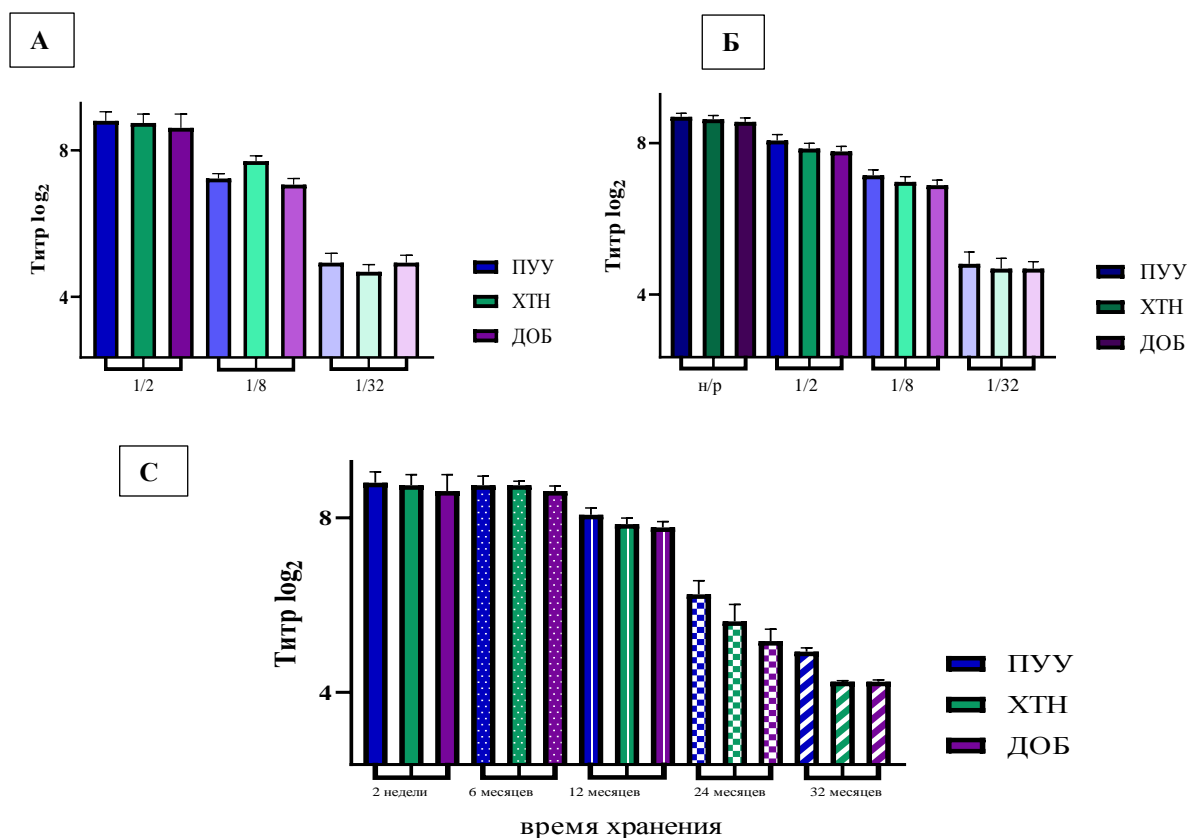


Рисунок 3 - Динамика нейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных мышей. А – на нулевом сроке хранения; Б – через 12 месяцев хранения вакцины; С – иммуногенность вакцины в разведении $\frac{1}{2}$ в зависимости от срока хранения.

Таким образом, в результате проведенных доклинических исследований было показано, что вакцина ГЛПС-Вак обладает высокой иммуногенностью, стабильностью и безопасностью, не проявляет токсического эффекта при введении лабораторным животным, не обладает аллергизирующим и иммунотоксическим действием, не проявляет эмбриотоксического и мутагенного действия, а также негативного влияния на репродуктивную функцию организма лабораторных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью диссертационной работы явились два последовательных направления:

- оптимизация технологических режимов на всех стадиях изготовления поливалентной (на основании 3-х хантавирусов) вакцины для профилактики ГЛПС, на основе данных, полученных за последние 20 лет в результате исследований по разработке биотехнологических основ создания хантавирусных вакцинных препаратов;
- доклинические исследования для доказательства безопасности и специфической эффективности поливалентной вакцины ГЛПС-Вак.

В результате проведенных исследований оптимизированы технологические этапы изготовления инактивированной вакцины против ГЛПС на основе трех вирусов, адаптированной

к эпидемиологическим условиям РФ, то есть, с использованием наиболее патогенных и эпидемиологически значимых хантавирусных штаммов. Приготовлены 3 серии экспериментальной вакцины для проведения доклинических исследований. Все методические подходы, в соответствии с полученными результатами, могут быть использованы для освоения промышленного производства вакцины ГЛПС-Вак.

Токсикологические исследования включали в себя изучение острой и хронической токсичностей, аллергизирующих свойств вакцины, влияния вакцины на иммунную систему, мутагенности, репродуктивной токсичности и эмбриотоксичности вакцины.

Показано, что вакцина ГЛПС-Вак не токсична, не обладает аллергизирующими, иммунотоксическими и мутагенными свойствами, не проявляет эмбриотоксического действия, а также негативного влияния на репродуктивную функцию организма лабораторных животных.

Вакцина ГЛПС-Вак является безопасной, высоко иммуногенной и стабильной при хранении в регламентируемых условиях (6 ± 2 °С).

Широкое распространение, высокие показатели заболеваемости людей, значительная частота тяжелых форм течения болезни, сопровождающихся длительным периодом пониженной трудоспособности, отсутствие специфических средств лечения и профилактики обуславливают высокую актуальность и социальную и медицинскую значимость проблемы ГЛПС как в России, так и во многих странах мира.

Социально-экономическое значение ГЛПС для общества огромно и связано с её широкой распространенностью и высокой затратностью на лечение и реабилитацию. Весьма важной является оценка социально-экономических затрат, в том числе прямых и непрямых, связанных с лечением больных ГЛПС (т.е. фактическая “стоимость” этого заболевания для общества и индивидуума). На лечение больных ГЛПС расходуются огромные средства, существенно превышающие бюджетные затраты на другие инфекции. Так, прямые медицинские затраты на лечение одного больного ГЛПС в России оцениваются, согласно различным источникам, от 20 до 30 тысяч рублей, включая: оплату диагностических мероприятий, длительного (3-4 недели и более) стационарного лечения, в том числе и с применением гемодиализа (подключение к аппарату искусственной почки), лабораторных и инструментальных исследований, зарплаты участвующего в обследовании, лечении и реабилитации медицинского персонала, а также оплату ряда немедицинских услуг (транспорта, питания и др.). Непрямые затраты, как правило, превышают прямые в 2-3 раза и составляют 40 – 60 тысяч рублей на лечение одного больного ГЛПС. Если говорить о нашей стране, то социально-экономические потери усугубляются тем, что из числа заболевших ГЛПС до 85% составляют мужчины в возрасте от 20 до 40 лет, то есть. наиболее демографически, экономически и социально продуктивная часть населения, несущая большую долю ответственности за финансовую поддержку и заботу о других. Создание вакцины против ГЛПС и ее широкое внедрение в практику здравоохранения позволит в значительной

степени уменьшить тяжесть социально-экономических последствий, связанных с высокой заболеваемостью ГЛПС, сопровождающейся нередко летальным исходом. Результаты анализа структуры заболеваемости ГЛПС и иммунного статуса здорового населения по отношению к возбудителю этой инфекции в России свидетельствуют о том, что показания к вакцинации против ГЛПС не могут быть ограничены определенной группой повышенного риска и, практически, в равной степени распространяются на все профессиональные группы городского и сельского населения эндемичных территорий.

Население эндемичных территорий, нуждающееся в вакцинопрофилактике этой инфекции, составляет только в России около 20 миллионов человек, что обуславливает высокую коммерческую ценность вакцины и, соответственно значительную финансовую прибыль от реализации вакцины.

Кандидатная поливалентная вакцина для профилактики ГЛПС успешно прошла комплексные доклинические испытания, что может явиться основанием для проведения клинических испытаний.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизированы биотехнологические этапы изготовления поливалентной (на основе отечественных штаммов 3-х хантавирусов) инактивированной вакцины против ГЛПС, не имеющей аналогов в мире.
2. Результаты доклинических исследований являются доказательством безопасности и высокой иммуногенной активности вакцины ГЛПС-Вак. Вакцина индуцирует выработку нейтрализующих антител по отношению к каждому из составляющих её вирусов – возбудителей ГЛПС у 100% мышей BALB/c.
3. Вакцина не токсична при испытании на аутбредных белых мышах и морских свинках как при однократном, так и при повторных введениях в дозах, суммарно значительно превышающих вакцинирующие для человека.
4. Не выявлено иммунотоксического влияния вакцины на В-клеточный и Т-клеточный иммунитет на модели мышей линии СВА, а также проявлений алергизации, вызванных введением вакцины морским свинкам.
5. Вакцина не нарушает репродуктивную функцию экспериментальных животных и не оказывает эмбриотоксического воздействия при длительном введении крысам в дозах, суммарно значительно превышающих вакцинирующие для человека.
6. Вакцина не проявляет мутагенных свойств в тесте Эймса на тестерных штаммах *Salmonella typhimurium*.
7. Разработаны протоколы доклинических исследований вакцины против ГЛПС, а также соответствующие нормативно-технические документы, включая проекты опытно-промышленного регламента, фармакопейной статьи предприятия, инструкции по применению

вакцины, брошюры исследователя и протокола клинического исследования.

8. Результаты доклинических исследований могут быть основой для перехода к I фазе клинических испытаний поливалентной вакцины ГЛПС-Вак.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Синюгина А. А.**, Дзагурова Т. К., Ишмухаметов А. А., Баловнева М. В., Курашова С. С., Коротина Н. А., Егорова М. С., Ткаченко Е. А. Доклинические исследования поливалентной вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2019. – Т. 18. – № 4. – С. 52-58. doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-52-58, IF 1.143 РИНЦ (**ВАК**).
2. **Синюгина А. А.**, Ишмухаметов А. А., Дзагурова Т. К., Баловнева М. В., Егорова М. С., Курашова С. С., Коротина Н. А., Леонович О. А., Балкина А. С., Ткаченко Е. А. Вакцины для профилактики хантавирусных лихорадок. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2019. – Т. 18. – № 5. – С. 98-108. doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-5-96-108, IF 1.143 РИНЦ (**ВАК**).
3. Dzagurova T. K., **Siniugina A. A.**, Ishmukhametov A. A., Egorova M. S., Kurashova S. S., Balovneva M. V., Deviatkin A. A., Tkachenko P. E., Leonovich O. A., Tkachenko E. A. Pre-Clinical Studies of Inactivated Polyvalent HFRS Vaccine. // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2020. – Vol. 10. – P. 545372. doi: 10.3389/fcimb.2020.545372, IF 4,123 WoS
4. Tkachenko E. A., Ishmukhametov A. A., Dzagurova T. K., Bernshtein A. D., Morozov V. G., **Siniugina A. A.**, Kurashova S. S., Balkina A. S., Tkachenko P. E., Kruger D. H., Klempa B. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. // Emerging infectious diseases. – 2019. – Vol. 25. – № 12. – С. 2325-2328. doi: 10.3201/eid2512.181649, IF 7,420 WoS.
5. Ткаченко Е. А., Ишмухаметов А. А., Дзагурова Т. К., **Синюгина А. А.**, Коротина Н. А., Набатников П. А., Соцкова С. Е., Баловнева М. В., Малкин А. Е. Разработка экспериментально-промышленной технологии производства вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом. // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской техники. – 2015. – № 6. – С.47-54. IF 0.308 РИНЦ (**ВАК**).
6. Дзагурова Т. К., Иванов А. П., Коротина Н. А., Малкин А. Е., **Синюгина А. А.**, Соцкова С. Е., Ишмухаметов А. А., Ткаченко Е. А. Разработка лабораторных методов и промышленной технологии производства препаратов для специфической диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом. // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской техники. – 2015. – № 10. – С. 44-49. IF 0.308 РИНЦ (**ВАК**).
7. Ткаченко Е. А., **Синюгина А. А.**, Ишмухаметов А. А., Баловнева М. В., Курашова С. С., Егорова М. С., Блинова Е. А., Морозов В. Г., Транквилевский Д. В., Дзагурова Т. К. Современное состояние проблемы ГЛПС в России. Материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных». Ставрополь. 24-25 апреля 2019 г., С.75-76. РИНЦ.
8. Дзагурова Т. К., **Синюгина А. А.**, Курашова С. С., Егорова М. С., Баловнева М. В., Леонович О. А., Ишмухаметов А. А., Ткаченко Е. А. Технологические аспекты усовершенствования вакцин против ГЛПС. Материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных». Ставрополь. 24-25 апреля 2019 г., С. 260-262, РИНЦ.
9. Ткаченко Е. А., Дзагурова Т. К., Бернштейн А. Д., **Синюгина А. А.**, Коротина Н. А., Баловнева М. В., Балкина А. С., Егорова М. С., Курашова С. С., Ишмухаметов А. А., Морозов В. Г., Юничева Ю. В., Транквилевский Д. В. ГЛПС в России: успехи и актуальные проблемы на современном этапе. Сборник трудов региональной научно-практической конференции «Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: эпидемиология, профилактика и диагностика на современном этапе». 10-октября 2019 г. Казань. С. 117-124. РИНЦ.
10. **Синюгина А. А.** Процесс лиофилизации (сублимационного высушивания) продукта. / В кн.: Биофармацевтическое производство. Разработка, проектирование и внедрение

- производственных процессов. Г. Ягшис, Е. Линдског, К. Лаки, П. Галлихер. Перевод с англ., под ред. Ишмухаметова А. А., Пятигорской Н. В. – М.: Изд. Профессия, 2020. – Т. 1. – Глава 15-1. – С. 391-396. ISBN 978-5-91884-116-7.
11. Kurashova S. S., Dzagurova T. K., **Siniugina A. A.**, Egorova M. S., Balovneva M. V., Ishmukhametov A. A., Tkachenko E. A. Evaluation of adjuvants efficiency in the HFRS vaccine. Book of Abstracts. 11th International Conference on Hantaviruses. 1-4 September 2019. Leuven, Belgium. P. 97.
 12. Dzagurova T. K., **Siniugina A. A.**, Ishmukhametov A. A., Egorova M. S., Balovneva M. V., Kurashova S. S., Leonovich O. A., Tkachenko E. A. Pre-clinical studies of inactivated combined HFRS vaccine. Book of Abstracts. 11th International Conference on Hantaviruses. 1-4 September 2019. Leuven, Belgium. P. 98.
 13. Дзагурова Т. К., **Синюгина А. А.**, Ишмухаметов А. А., Коротина Н. А., Набатников П. А., Баловнева М. В., Курашова С. С., Егорова М. С., Леонович О. А., Ткаченко Е. А. Разработка экспериментально – промышленной технологии производства вакцины против ГЛПС. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы». Москва, 17-18 октября 2019 г. С. 15. РИНЦ.
 14. **Синюгина А. А.**, Дзагурова Т. К., Ишмухаметов А. А., Баловнева М. В., Курашова С. С., Коротина Н. А., Егорова М. С., Ипатова Е. Г., Гмыль Л. В., Ткаченко Е. А. Доклинические исследования вакцины против ГЛПС. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы. Москва, 17-18 октября 2019 г. С. 45. РИНЦ.
 15. Ткаченко Е. А., Ишмухаметов А. А., Дзагурова Т. К., **Синюгина А. А.**, Бернштейн А. Д., Баловнева М. В., Курашова С. С., Егорова М. С., Леонович О. А., Попова Ю. В. Актуальные проблемы ГЛПС в России на современном этапе. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы». Москва, 17-18 октября 2019 г. С. 50. РИНЦ.
 16. Balovneva M. V., Leonovich O. A., Egorova M. S., Kurashova S. S., **Sinugina A. A.**, Dzagurova T. K., Approaches to improve the chromatographic purification of the vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. International Society for vaccines. Annual congress. 27-29 October 2019. Belgium. P. 15.
 17. **Патент:**
Дзагурова Т. К., Ткаченко Е. А., **Синюгина А. А.**, Ишмухаметов А. А. Соцкова С. Е. Штамм вируса для изготовления вакцинных препаратов против геморрагической лихорадки с почечным синдромом (варианты). // Патент на изобретение RU 2683508 С1, 28.03.2019. Заявка № 2018118856 от 23.05.2018. РИНЦ.

Список сокращений

ИФА	-	иммуноферментный анализ
МФА	-	метод флюоресцирующих антител
ПЦР	-	полимеразная цепная реакция
РН	-	реакция нейтрализации вируса антителами
ФОЕ	-	фокус образующие единицы, представляют собой колонии инфицированных хантавирусами клеток
АТ	-	антитела
АГ	-	антиген
Vero	-	перевиваемая культура клеток почек зеленой мартышки
АКА	-	активная кожная анафилаксия

в/м	- внутримышечное введение
п/к	- подкожное введение
ГЭ	- гематоксилин-эозин
ГЗТ	- гиперчувствительность замедленного типа
ИР	- индекс реакции
КП	- конъюнктивальная проба
ТД	- терапевтическая доза
ЭБ	- эритроциты барана
GLP	- «Good Laboratory Practice»
F	- Female (женский)
$M \pm m$	среднее \pm стандартная ошибка среднего
M	- Male (мужской)
Me	- Медиана
MHC	- Major Histocompatibility Complex (Главный комплекс гистосовместимости)
N, n	- количество животных