

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-4-52-58>

Доклинические исследования поливалентной вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом

A. A. Синюгина¹, Т. К. Дзагурова¹, А. А. Ишмухаметов^{1,2}, М. В. Баловнева¹, С. С. Курашова¹, Н. А. Коротина¹, М. С. Егорова¹, Е. А. Ткаченко^{*1,2}¹ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН», Москва²ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва

Резюме

Актуальность. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – вирусный нетрансмиссивный зооноз, широко распространённый в Евразии, а в России занимающий ведущее место среди зоонозных вирусных инфекций и одно из первых мест среди всех природно-очаговых болезней человека. **Цель.** Получение доказательств безопасности, качества и эффективности поливалентной вакцины против ГЛПС в результате проведения её доклинических исследований с применением научных методов оценок, соответствующих требованиям и правилам надлежащей лабораторной практики. **Материалы и методы.** Для проведения доклинических исследований поливалентной вакцины против ГЛПС использовали материалы и методы в строгом соответствии с требованиями регламентирующих официальных документов, а также описанные ранее методы, применяемые для контроля вакцины на технологических этапах её изготовления. **Результаты.** Данные, полученные в результате проведения доклинических исследований поливалентной вакцины против ГЛПС, свидетельствуют о высокой иммуногенности и стабильности вакцины, отсутствие: острой и хронической токсичности, алергизирующих, иммунотоксических, мутагенных свойств, а также токсического действия на репродуктивные органы животных, на развитие эмбрионов и на потомство, родившееся от самок, получавших вакцину в течение 20 дней беременности. **Заключение.** Результаты проведенных доклинических исследований поливалентной вакцины против ГЛПС соответствуют требованиям, предъявляемым к иммунобиологическим медицинским препаратам, вводимым людям, и являются основанием для проведения 1-й фазы клинических испытаний.

Ключевые слова: ГЛПС, вирусы Пуумала, Добрава-Белград, Хантаан, вакцина, доклинические исследования**Конфликт интересов не заявлен.**

Для цитирования: Синюгина А. А., Дзагурова Т. К., Ишмухаметов А. А. и др. Доклинические исследования поливалентной вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2019; 18 (3): 52–58. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-4-52-58>.

Pre-Clinical Studies of Inactivated Polyvalent Vaccine Against Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome

A. A. Sinyugina¹, T. K. Dzagurova¹, A. A. Ishmukhametov^{1,2}, M. V. Balovneva¹, S. S. Kurashova¹, N. A. Korotina¹, M. S. Egorova¹, E. A. Tkachenko^{*1,2}¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow;²Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

Relevance. Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is a non-transmissible viral zoonosis widespread in Eurasia, and in Russia it occupies a leading position among zoonotic viral infections and one of the first places among all natural focal human diseases. **Aim.** Obtaining evidence of the safety, quality and efficacy of a polyvalent vaccine against HFRS as a result of its preclinical studies using scientific assessment methods that meet the requirements and rules of good laboratory practice. **Materials and methods.** For preclinical studies of the polyvalent vaccine against HFRS, the materials and methods were used in strict accordance with the requirements of the regulatory documents, as well as previously described methods used to control the vaccine at the technological stages of its manufacture. **Results.** The data obtained as a result of preclinical studies of the polyvalent vaccine against

* Для переписки: Ткаченко Евгений Александрович, д.м.н., профессор, руководитель научного направления Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, Москва, 108819. +7 (495) 841–90–02, sue_polio@chumakovs.su. ©Синюгина А. А. и др.

** For correspondence: Tkachenko Evgeniy A., Dr. Sci. (Med.), professor, scientific supervisor of Chumakov Federal scientific center of research and development of immune-and-biological products, Premises 8, building 1, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement «Moskovskiy», Moscow, 108819, Russian Federation. +7 (495) 841–90–02, sue_polio@chumakovs.su. © Sinyugina AA et al.

HFRS indicate a high immunogenicity and stability of the vaccine, the absence of: acute and chronic toxicity, allergenic, immunotoxic and mutagenic, as well as toxic effects on the reproductive organs of animals, embryo development and offspring, born to females who received the vaccine within 20 days of gestation. **Conclusion.** The obtained results of preclinical studies comply with the requirements for immunobiological medical preparations designed for humans, and are the basis for conducting the 1st phase of clinical trials the polyvalent vaccine against HFRS.

Key words: hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), Puumala virus, Dobrava-Belgrade virus, Hantaan virus, vaccine, preclinical studies

No conflict of interest to declare.

For citation: Sinyugina AA, Dzagurova TK, Ishmukhametov AA et al. Pre-Clinical Studies of Inactivated Polivalent Vaccine Against Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2019; 18 (3): 52–58 (In Russ.). [https://doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-52-58](https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-4-52-58).

Введение

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – вирусный нетрансмиссивный зооноз, широко распространённый в Евразии, а в России занимающий ведущее место среди зоонозных вирусных инфекций и одно из первых мест среди всех природно-очаговых болезней человека.

По данным Роспотребнадзора, только с 2000 по 2018 гг. в 68 из 85 субъектов РФ было зарегистрировано 137 430 случаев заболевания ГЛПС, включая 3300 случаев среди детей в возрасте до 14 лет. У 570 больных ГЛПС закончилась летальным исходом.

Возбудителями ГЛПС в России являются вирусы: Пуумала и Добrava-Белград (геноварианты Куркино и Сочи) на территории Европейской части России, Хантаан, Сеул и Амур в Азиатской части России, главным образом на Дальнем Востоке. Вирусы, иммунологически и генетически значительно отличающиеся друг от друга, поддерживают своё существование в природе посредством шести разных видов мышевидных грызунов, являющихся источниками заражения людей.

Противоэпидемические мероприятия при ГЛПС направлены, в основном, на ограничение возможных контактов людей с грызунами с целью снижения риска заражения. Из всего комплекса мер неспецифической профилактики ГЛПС наиболее часто применяемой остается дератизация. Несмотря на определенную эффективность, дератизационные мероприятия для неспецифической профилактики ГЛПС обходятся довольно дорого и, кроме того, их применение обеспечивает лишь кратковременное снижение численности грызунов на обработанных территориях и не решает проблемы ликвидации природного резервуара хантавируса.

Наиболее эффективным методом борьбы с ГЛПС является вакцинопрофилактика, что было продемонстрировано на протяжении последних 20 лет в Китае, Южной и Северной Корее. Однако ни одна из этих вакцин не может применяться в европейских регионах России, поскольку все они производятся на основе хантавирусов Хантаан или Сеул и не обладают защитным действием против вируса Пуумала – основного возбудителя ГЛПС у жителей Европейской части России.

В ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» на основе отечественных штаммов вирусов

Пуумала, Добrava-Белград (геновариант Сочи) и Хантаан разработана поливалентная инактивированная вакцина против ГЛПС.

Успешное внедрение в практику здравоохранения новой вакцины возможно лишь при наличии доказанной в соответствии с современными требованиями высокой степени безопасности и эффективности её применения. Первым этапом в этом направлении являются доклинические исследования. Цель статьи – представить доказательства безопасности, качества и эффективности поливалентной вакцины против ГЛПС в результате проведения её доклинических исследований с применением научных методов оценок, соответствующих требованиям и правилам надлежащей лабораторной практики.

Материалы и методы

Поливалентная вакцина против ГЛПС (далее вакцина) представляет собой очищенные инактивированные формалином и сорбированные на гидроокиси алюминия хантавирусы Пуумала, Хантаан, Сочи, полученные путем репродукции в перевиваемой культуре клеток VERO. Одна доза (1,0 мл) содержит: действующее вещество – инактивированные хантавирусы Пуумала, Хантаан, Сочи; вспомогательные вещества: альбумин человека (донорский для внутривенного капельного введения, 1 мг) – стабилизатор; фосфатный буфер – 0,5 мл, среда 199 Хенкс – растворитель/стабилизатор до 0,5 мл; алюминия гидроксид (1,0 мг) – сорбент. Для проведения доклинических исследований вакцины, включающих определение следующих характеристик: иммуногенность и стабильность, острая и хроническая токсичность, алергизирующие и иммунотоксические свойства, эмбриотоксическое воздействие, влияние вакцины на репродуктивную функцию, а также мутагенные свойства вакцины, использовали материалы и методы в строгом соответствии с требованиями регламентирующих официальных документов [1–12]. Установление мутагенных свойств вакцины было проведено в тесте Эймса в микропланшетном формате (Ames MPFTTM 98/100/1535/1537, Xenometrix, Швейцария).

Кроме того, были использованы описанные ранее методы [13–14], применяемые для контроля вакцины на технологических этапах её изготовления.

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

В экспериментах использовались половозрелые и неполовозрелые аутбредные мыши, крысы морские свинки и мыши линии BALB/c. Животные поступали из Филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России.

Содержание животных. Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных», Правилами надлежащей лабораторной практики, с правилами, утвержденным МЗ СССР 06.07.73 г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Эвтаназия осуществлялась с помощью CO₂-камеры. Животные находились там до полной потери сознания, затем животное извлекалось, вскрывалась грудная полость, и осуществлялось полное стерильное обескровливание шприцем из полостей сердца.

Уровень статистической значимости различий между выборками оценивали с помощью критериев Манна Уитни. 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. Результаты исследования иммуногенной стабильности вакцины проанализированы в программе GraphPad Prism версии 8.2.0.

Результаты и обсуждение

1. Иммуногенность и стабильность вакцины

Исследования иммуногенной активности готовой вакцины на разных сроках её хранения в регламентированных условиях (6, 12 и 24 месяцев) проводили с помощью иммунизации мышей BALB/c с последующим определением в сыворотках крови животных нейтрализующих антител к хантавирусам Пуумала (ПУУ), Хантаан (ХТН) и Сочи (СОЧИ) (табл. 1).

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 (табл. 2).

Аномальная токсичность: ни у одного подопытного животного (белые беспородные мыши и морские свинки) не выявлено наличия инфильтратов в месте введения вакцины. Не было отмечено снижения веса у животных через 7 суток после введения вакцины, что свидетельствует об отсутствии аномальной токсичности испытуемых образцов вакцины.

Пирогенность вакцины: после введения трем кроликам до и после хранения в регламентируемых условиях в течение 2 лет вакцина оставалась апиrogenной.

Таким образом, 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.

2. Исследование острой токсичности вакцины

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.

Проведенные экспериментальные исследования острой токсичности на аутбредных мышках 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 мышках значения ЛД₅₀ установить не удалось, в связи с отсутствием гибели экспериментальных животных. Максимальная доза вакцины при внутримышечном введении составила 1,5 дозы на половозрелую мышку 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 оказало отсроченного влияния на общее состояние, ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональный статус экспериментальных животных.

Вскрытие животных спустя 14 дней после 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 стромах внутренних органов.

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

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

Table 1. Neutralizing antibodies in the blood sera of BALB / c mice after immunization with the vaccine with different storage time

Разведение вакцины Vaccines dilution	Вирусы Viruses	Сроки хранения вакцины Storage time vaccines							
		0		6 месяцев months		12 месяцев months		24 месяца months	
		Среднее арифм. титров Arithmetic mean titers	Среднее геометр. титров Geometric mean titers	Среднее арифм. титров Arithmetic mean titers	Среднее геометр. титров Geometric mean titers	Среднее арифм. титров Arithmetic mean titers	Среднее геометр. титров Geometric mean titers	Среднее арифм. титров Arithmetic mean titers	Среднее геометр. титров Geometric mean titers
н/р not dilution	ПУУ Puumala virus	-	-	-	-	544 ± 48,8	9,1 ± 0,1	140 ± 14,4	7,1 ± 0,2
	ХТН Hantaan virus	-	-	-	-	512 ± 52,2	8,9 ± 0,5	80 ± 15,4	6,3 ± 0,3
	СОЧИ Sochi virus	-	-	-	-	480 ± 53,3	8,8 ± 0,2	68 ± 12,6	6,1 ± 0,2
1/2	ПУУ Puumala virus	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 Hantaan virus	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 Sochi virus	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 Puumala virus	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 Hantaan virus	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 Sochi virus	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 Puumala virus	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 Hantaan virus	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 Sochi virus	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

Примечание: *среднеарифметическое титров антител ± стандартная ошибка, **среднегеометрическое титров антител, выраженное в log₂ ± стандартная ошибка.

Note: *arithmetic mean titres ± standard error titers, **geometric mean ± standard error

3. Исследование хронической токсичности вакцины

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 аутобредных 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,

Таблица 2. Физико-химический контроль вакцины через 2 года хранения в регламентированных условиях
Table 2. Physico-chemical control of the vaccine after 2 years of storage under regulated conditions

№ п/п	Контролируемый параметр Controlled parameter	Требования (Спецификация) Requirements	Результаты контроля Results of control
1	Описание Description	Непрозрачная суспензия белого цвета Opaque white suspension	Непрозрачная суспензия белого цвета Opaque white suspension
2	Извлекаемый объем, мл Retrievable volume, ml	Не менее номинального (1,0) Not less than nominal (1,0)	Не менее номинального (1,1) Not less than nominal (1,0)
3	Размер частиц Particle size	Вакцина должна свободно проходить в шприц через иглу №0840 The vaccine should pass freely into the syringe through the needle No. 0840	Вакцина проходит свободно в шприц через иглу №0840 The vaccine passes freely into the syringe through the needle No. 088400
4	Механические включения Mechanical inclusions	Не должна содержать видимых механических включений Must not contain visible mechanical impurities	Видимые механические включения не обнаружены No visible mechanical inclusions detected
5	Время седиментационной устойчивости Sedimentation stability time	При встряхивании не должна расслаиваться в течение 5 мин When shaking, do not delaminate for 5 minutes	В течение 5 мин после встряхивания не расслаивается Within 5 minutes after shaking does not exfoliate
6	pH	От 7,2 до 7,6 7.2 to 7.6	7,4
7	Бактериальные эндотоксины, ЕЭ/доза Bacterial endotoxins, EU/ dose	Не более 25 No more than 25	Менее 25 Less than 25

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 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, а также макроскопических изменений головного мозга, внутренних и эндокринных органов, гиперволемиического 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. Результаты гистологического исследования показали, что пролонгированное введение

вакцины мышам и морским свинкам не сопровождалось развитием дистрофических, деструктивных, очаговых склеротических изменений в паренхиматозных клетках и строме внутренних органов.

Таким образом, хронической токсичности вакцины не было выявлено.

4. Исследование аллергизирующего действия вакцины

Для определения аллергизирующего действия вакцины использовали тест «реакция общей анафилактики» у половозрелых и неполовозрелых животных, а также тест «конъюнктивальная проба» у половозрелых животных.

При постановке теста «реакция общей анафилактики» 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 аллергической реакции (беспокойство, учащение дыхания, почесывание мордочки и непроизвольное 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 разрешающей дозы вакцины животным не было выявлено развития аллергического конъюнктивита при оценке через 15 минут (немедленный тип), а также через 24 и 48 часов (замедленный тип).

5. Исследование иммуотоксичности вакцины

Целью исследования было установление иммуотоксических свойств вакцины при введении половозрелым и неполовозрелым мышам. Для определения антител использовали реакцию гемагглютинации эритроцитов барана. Иммуотоксическое воздействие вакцины на Т-клеточный иммунитет *in vivo* оценивали по реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей к эритроцитам барана.

Сравнение индекса 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 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 \log_2), 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.

6. Исследование эмбриотоксического действия вакцины

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 действия 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 отклонений от нормы.

7. Исследование влияния вакцины 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 групп. 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.

8. Исследование мутагенных свойств вакцины в тесте Эймс

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 к тесту OECD 471. В варианте без метаболической активации микросомальной фракцией S9 применяли 2-нитрофлуорен (2мкг/мл; штамм TA98), N-оксид-4-нитрохинолин (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 свидетельствуют об отсутствии мутагенных свойств вакцины в тесте Эймса.

Таким образом, полученные нами результаты проведения доклинических исследований поливалентной

вакцины против ГЛПС соответствуют требованиям, предъявляемым к иммунобиологическим медицинским препаратам, вводимым людям, и являются основанием для проведения 1-й фазы клинических испытаний.

Литература

1. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; 2010.
2. «Правила надлежащей лабораторной практики». Приказ Минздрава Российской Федерации от 01.04.2016 г. №199Н (Зарегистрировано в Минюсте РФ 15.08.2016, регистрационный № 43232); 2016.
3. «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств» (в книге «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств». Под ред. А.Н. Миронова. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. С. 13–51).
4. «Методические рекомендации по оценке алергизирующих свойств лекарственных средств» (там же, с. 51–64).
5. «Методические рекомендации по оценке иммунотоксического действия лекарственных средств» (там же, с. 64–80).
6. «Методические рекомендации по оценке мутагенных свойств лекарственных средств» (там же, с. 94–115).
7. «Методические рекомендации по изучению иммуотропной активности лекарственных средств» (там же, с. 624–640).
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова (Иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая. М.: Гриф и К; 2012. 536 с.
9. Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. Основные положения. РД 42-28-8-89. Москва; 1989.
10. Методические рекомендации Управления государственного контроля лекарственных средств и медицинской техники Минздрава РФ от 29 декабря 1997 г.
11. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей от 18 марта 1986 года. (Текст изменен в соответствии с положениями Протокола (ETS № 170), дата его вступления в силу 2 декабря 2005 года).
12. Annex 1, WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines, WHO Technical Report Series, No. 927; 2005.
13. Бархалева О.А., Воробьева М.С., Ладыженская И.П. и др. Вакцина против геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Биопрепараты. 2011. № 1. С. 27–30.
14. Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Юничева Ю.В. и др. Обнаружение и клинико-этиологическая характеристика ГЛПС в субтропической зоне Краснодарского края // ЖМЭИ. 2008. № 1. С. 12–16.

References

1. Federal Law of 12.04.2010 No. 61-FZ "On Circulation of Medicines"; 2010. (In Russ.)
2. «Rules of good laboratory practice». Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of April 1, 2016 No. 199N (Registered in the Ministry of Justice of the Russian Federation on August 15, 2016, registration No. 43232); 2016. (In Russ.)
3. «Guidelines for the study of the general toxic effect of drugs» in the book «Guidelines for the conduct of preclinical studies of drugs. Edited by A. Mironov. Part One. M.: Grief and Co.; 2012. P. 13–51). (In Russ.)
4. «Guidelines for the evaluation of allergenic properties of drugs» (ib. P. 51–64). (In Russ.)
5. «Guidelines for the evaluation of the immunotoxic effect of drugs» (ib. P. 64–80). (In Russ.)
6. «Guidelines for the evaluation of mutagenic properties of drugs» (ib. P. 94–115). (In Russ.)
7. «Guidelines for the study of the immunotropic activity of drugs» (ib. P. 624–640). (In Russ.)
8. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Ed. AN Mironova (Immunobiological drugs). Part two. M.: Grief and K; 2012. 536 p. (In Russ.)
9. Preclinical testing of new medical immunobiological preparations. The main provisions. RD 42-28-8-89. Moscow; 1989. (In Russ.)
10. Methodical recommendations of the Office of State Control medicines and medical equipment of the Ministry of Health of the Russian Federation of December 29, 1997. (In Russ.)
11. The European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes of March 18, 1986. (Text modified in accordance with the provisions of the Protocol (ETS No. 170), its effective date is December 2, 2005). (In Russ.)
12. Annex 1, WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines, WHO Technical Report Series, No. 927; 2005.
13. Barkhaleva OA, Vorobyova MS, Ladyzhenskaya IP, et al. Hemorrhagic fever vaccine with renal syndrome. Biological products. 2011;1:27–30. (In Russ.)
14. Dzagurova TK, Tkachenko EA, Yunicheva YuV, et al. Detection and clinical and etiological characteristics of HFRS in the subtropical zone of the Krasnodar Territory. ZhMEI. 2008;1:12–16. (In Russ.)

Об авторах

- **Александра Александровна Синюгина** – научный сотрудник, руководитель производственного направления Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, Москва, 108819. +7 (495)841-0173, asina.78@mail.ru. ORCID: <https://doi.org/0000-00026416-2573>.
- **Тамара Казбековна Дзагурова** – заведующая лабораторией Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, Москва, 108819. +7 (495)841-094, centrgrlps@yandex.ru. ORCID: <https://doi.org/0000-0002-6656-1682>.
- **Айдар Айратович Ишмухаметов** – генеральный директор Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, Москва, 108819. +7 (495)841-9002, ishmukhametov@chumakovs.su. ORCID: <https://doi.org/0000-0001-6130-4145>.
- **Мария Владимировна Баловнева** – старший научный сотрудник Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, Москва, 108819. +7 (495)841-094, mashasm@yandex.ru. ORCID: <https://doi.org/0000-0003-2198-7521>.
- **Светлана Сергеевна Курашова** – младший научный сотрудник Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, Москва, 108819. +7 (495)841-094, svetlanak886@yandex.ru. ORCID: <https://doi.org/0000-0001-9934-699X>.
- **Наталья Александровна Коротина** – научный сотрудник Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, Москва, 108819. +7 (495)841-094, ryggik@gmail.com. ORCID: <https://doi.org/0000-0002-9038-7717>.
- **Мария Сергеевна Егорова** – старший научный сотрудник Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, Москва, 108819. +7 (495)841-094, masha0787@mail.ru. ORCID: <https://doi.org/0000-0003-3642-6444>.
- **Евгений Александрович Ткаченко** – руководитель научного направления Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, Москва, 108819. +7 (495)841-9035, evgeniytkach@mail.ru. ORCID: <https://doi.org/0000-0002-6829-1241>.

Поступила: 23.05.2019. Принята к печати: 22.08.2019.
Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Aleksandra A. Sinyugina** – researcher, head of production of Chumakov Federal scientific center of research and development of immune-and-biological products, Premises 8, building 1, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement «Moskovskiy», Moscow, 108819, Russian Federation. +7 (495)841-0173, asina.78@mail.ru. ORCID: <https://doi.org/0000-00026416-2573>.
- **Tamara K. Dzagurova** – head of laboratory of Chumakov Federal scientific center of research and development of immune-and-biological products, Premises 8, building 1, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement «Moskovskiy», Moscow, 108819, Russian Federation. +7 (495)841-094centrgrlps@yandex.ru. ORCID: <https://doi.org/0000-0002-6656-1682>.
- **Aidar A. Ishmukhametov** – general director of Chumakov Federal scientific center of research and development of immune-and-biological products, Premises 8, building 1, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement «Moskovskiy», Moscow, 108819, Russian Federation. +7 (495)841-9002, ishmukhametov@chumakovs.su. ORCID: <https://doi.org/0000-0001-6130-4145>.
- **Maria V. Balovneva** – leading researcher of Chumakov Federal scientific center of research and development of immune-and-biological products, Premises 8, building 1, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement «Moskovskiy», Moscow, 108819, Russian Federation. +7 (495)841-094, mashasm@yandex.ru. ORCID: <https://doi.org/0000-0003-2198-7521>.
- **Svetlana S. Kurashova** – junior researcher of Chumakov Federal scientific center of research and development of immune-and-biological products, Premises 8, building 1, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement «Moskovskiy», Moscow, 108819, Russian Federation. +7 (495)841-094, svetlanak886@yandex.ru. ORCID: <https://doi.org/0000-0001-9934-699X>.
- **Natalya A. Korotina** – researcher of Chumakov Federal scientific center of research and development of immune-and-biological products, Premises 8, building 1, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement «Moskovskiy», Moscow, 108819, Russian Federation. +7 (495)841-094, ryggik@gmail.com. ORCID: <https://doi.org/0000-0002-9038-7717>.
- **Maria S. Egorova** – senior researcher of Chumakov Federal scientific center of research and development of immune-and-biological products, Premises 8, building 1, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement «Moskovskiy», Moscow, 108819, Russian Federation. +7 (495)841-094, masha0787@mail.ru. ORCID: <https://doi.org/0000-0003-3642-6444>.
- **Evgeniy A. Tkachenko** – scientific supervisor of Chumakov Federal scientific center of research and development of immune-and-biological products, Premises 8, building 1, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement «Moskovskiy», Moscow, 108819, Russian Federation. +7 (495)841-9035, evgeniytkach@mail.ru. ORCID: <https://doi.org/0000-0002-6829-1241>.

Received: 23.05.2019. Accepted: 22.08.2019.
Creative Commons Attribution CC BY 4.0.