Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Институт экспериментальной медицины»

(ФГБНУ «ИЭМ»)

На правах рукописи

Никифорова Александра Николаевна

БЕЗОПАСНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ ТРИВАЛЕНТНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ С НОВЫМ АДЪЮВАНТОМ

Специальность 03.02.02 «Вирусология»

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Руденко Лариса Георгиевна

Руководитель отдела вирусологии

им. А.А. Смородинцева, д.м.н., проф.

г. Санкт-Петербург – 2015 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДНИЕ

Актуальность темы исследования.

Грипп остается самым массовым инфекционным заболеванием с высокой смертностью, наносящим огромный экономический ущерб (Гендон, 2007; Петров, 2007). Особую опасность грипп представляет для детей младшего возраста, пожилых людей и лиц, страдающих различными хроническими заболеваниями (Dip & Cabrera, 2010; Rothberg & Haessler, 2010; Vabret et al., 2010).

Вопросы профилактики и лечения гриппа всегда были чрезвычайно важны для практического здравоохранения. Во всем мире признается, что вакцинация – наиболее оптимальный метод борьбы с этой инфекцией, который сочетает в себе высокую специфичность, профилактическую эффективность и экономичность (Медуницы, 2004). Гриппозные вакцины способны защитить от клинического заболевания 70-90 % взрослого населения, если антигены, содержащиеся в вакцине, совпадают с циркулирующими вирусными антигенами (WHO, 2005).

Для профилактики гриппа применяют живые и инактивированные вакцины. Основными преимуществами живых вакцин являются: простота технологии производства, неинвазивное введение, индуцирование всех звеньев иммунного ответа (местного, клеточного и гуморального), а также длительность создаваемого иммунитета (Донина и др., 2003; Petukhova et al., 2012). К сожалению, в России данная вакцина имеет ряд противопоказаний и не может применяться у детей младше 3 лет и ряда групп высокого риска, для которых рекомендуется использовать субъединичные и сплит-вакцины (Медуницы, 2004).

Основной проблемой инактивированных, особенно субъединичных вакцин, является их недостаточная иммуногенность для детей младшего возраста, пожилых лиц и людей с иммунодефицитными состояниями, а также в

отношении потенциально пандемических штаммов вируса гриппа (Baz et al., 2013; Even-Or et al., 2013).

Одним из способов повышения иммуногенности инактивированных гриппозных вакцин (ИГВ) является включение в их состав адъювантов. При этом открывается возможность производства вакцины с уменьшенным количеством антигена, что повышает уровень безопасности вакцины (Шальнова и др., 2012; Зубов и др., 1999). В настоящее время проводится оценка новых адъювантов, включая иммуностимуляторы, микрокорпускулярные носители и эмульсии, а также их различные комбинации (Петухова и др., 2013; Clegg et al., 2012; Cox et al., 2011; Petrovsky & Aguilar, 2004). В идеале адъювант должен быть стабильным, биодеградируемым и безопасным, а его производство - малозатратным (Fraser et al., 2007). Несмотря на активный научно-исследовательский поиск, выбор адъювантов, одновременно соответствующий всем требованиям безопасности, переносимости и эффективности, чрезвычайно мал. В этой связи разработка безопасных адъювантов, усиливающих иммуногенность вакцины и позволяющих существенно снизить содержание вирусных белков в прививочной дозе, является важной стратегией в развитии вакцинопрофилактики.

Степень разработанности темы исследования

Первые представления об адъювантах, позволяющих получить более выраженный иммунный ответ на антиген, появились еще в 1920-е годы (Ramon, 1924; Glenny & Südmersen, 1921). С тех пор было открыто большое количество соединений, обладающих адъювантными свойствами, но лишь незначительная их часть была одобрена к применению у человека (Batista-Duharte et al., 2013; Gupta & Siber, 1995; Stewart-Tull, 2000).

Перспективным направлением в разработке новых адъювантов являются исследования по изучению взаимодействия синтетических полимеров с макромолекулами биологического происхождения. Еще в 1974-1978 гг.

В.А. Кабанов, Р.В. Петров, Р.М. Хаитов и др. в экспериментах на животных обнаружили иммуностимулирующие свойства ряда линейных синтетических полиэлектролитов, в основе механизма действия которых лежит стимуляция различных звеньев иммунной системы: антителообразования, клеточного и врожденного иммунитета (Некрасов и др., 2009; Хаитов, 2005; Хаитов и Пинегин, 2000).

В 90-х годах в России разработана отечественная полимер-субъединичная вакцина Гриппол, в состав которой включен синтетический иммуномодулятор Полиоксидоний - первый препарат нового класса синтетических полиэлектролитов, который представляет собой N-оксидированное производное полиэтиленпиперозина. В основе механизма действия Полиоксидония лежит прямая активация фагоцитирующих клеток и естественных киллеров, а также стимуляция антителообразования (Некрасов и др., 2009; Хаитов, 2005; Хаитов и Пинегин, 2000). Однако имеются данные, указывающие на недостаточную иммуногенность данной вакцины у лиц пожилого возраста (Бурцева и др., 2000).

Другим полимерным соединением, обладающим иммуномодулирующими свойствами, является Совидон - сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона. Хотя иммуномодулирующие свойства препарата Совидон были известны с момента разработки, долгое время основное направление исследований было сфокусировано на его радиопротекторных свойствах (Калистратов и др., 1993; Калистратова и др., 2001). Параллельно с исследованиями антиканцерогенных свойств Совидона, был проведен ряд экспериментов по его включению в состав вакцинных препаратов для ветеринарии, которые показали высокую эффективность и отсутствие токсичности препарата (Кедик и др., 1993). Именно эти исследования стали предпосылкой изучения возможности применения Совидона в качестве адъюванта в составе вакцин, используемых для иммунизации людей, в

частности против такого социально значимого инфекционного заболевания как грипп.

Цель настоящей работы – разработка инактивированной тривалентной субъединичной гриппозной вакцины с сополимером 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона (Совидон), оценка ее безопасности и иммуногенности.

Задачи исследования:

1. Оценить чистоту и спектр антигенов, входящих в состав экспериментальной гриппозной вакцины.
2. Изучить морфологические характеристики экспериментальной гриппозной вакцины при добавлении адъюванта Совидон.
3. Изучить безопасность и антигенную активность экспериментальной гриппозной вакцины с адъювантом Совидон на животных.
4. Выбрать оптимальную дозу сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона (Совидон) для включения в состав инактивированной гриппозной вакцины.
5. Сравнить инактивированную гриппозную вакцину с Совидоном по профилю безопасности и иммуногенности с существующей на рынке вакциной того же типа (Гриппол) в клинических исследованиях.

Научная новизна. Создание инактивированной гриппозной вакцины с иммуномодулятором, ранее не использовавшимся в вакцинах для иммунизации людей. В ходе проведенных исследований:

- в составе гриппозной вакцины впервые использован сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона (Совидон) и определено его оптимальное содержание в инактивированной гриппозной вакцине;
- впервые в рамках исследований на лабораторных животных показана безопасность и иммуногенность инактивированной гриппозной вакцины с Совидоном;
- впервые инактивированная гриппозная вакцина с исследуемым адъювантом изучена в рамках клинических исследований на добровольцах в

возрасте 18 – 60 лет, где показана ее хорошая переносимость, низкая реактогенность, безопасность и иммуногенность.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выполненная работа представляет собой законченное научное исследование, имеющее ярко выраженную прикладную направленность. Разработка сезонной гриппозной инактивированной вакцины с новым адъювантом позволяет расширить спектр гриппозных вакцин для профилактики гриппа на территории РФ.

На основании результатов проведенных исследований оформлена нормативная документация (фармакопейная статья предприятия, инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения), разработан регламент производства и зарегистрирована новая инактивированная субъединичная гриппозная вакцина Совигрипп в РФ (регистрационное удостоверение № ЛП-001836 от 13.09.2012 г.).

Методология и методы исследования. В ходе проведения работы применялись стандартные биохимические, вирусологические и иммунологические методы. Более подробно этапы и методики проведения экспериментов отражены в разделе «Материалы и методы».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Экспериментальная субъединичная гриппозная вакцина Совигрипп имеет высокую степень очистки от «балластных» белков.

2. Антигены, входящие в состав вакцины, взаимодействуют с сополимером 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона (Совидон).

3. Инактивированная субъединичная гриппозная вакцина с адъювантом Совидон безопасна, и имеет высокую антигенную активность у животных при внутримышечном введении.

4. Увеличение дозы адъюванта Совидон в составе экспериментальной инактивированной гриппозной вакцины приводит к усилению иммуногенной активности вакцины.

5. Вакцина Совигрипп с содержанием Совидона 500 мкг/доза при однократном введении людям в возрасте 18-60 лет безопасна и приводит к формированию гуморального иммунного ответа, удовлетворяющего всем современным критериям, предъявляемым к инактивированным гриппозным вакцинам.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном планировании и непосредственном участии в проведении исследований. Данные по электронной микроскопии были получены в сотрудничестве с в.н.с. НИИВС им. Мечникова РАМН Лотте В.Д., по гистологическим исследованиям - Степановым Н.Н. и Плехановой Т.М. Помощь в организации работы с хорьками была оказана сотрудниками филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны» - «ВЦ», г. Сергиев Посад - Меркуловым В.А., Степановым Н.Н. и Плехановой Т.М.; в организации клинических исследований – сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, г. Санкт-Петербург - Ерофеевой М.К., Охапкиной Е.А., Евграфовым В.Д. и ГОУ ВПО ПГМА им. академика Е.А. Вагнера, г. Пермь - Фельдблюм И.В., Шишкиной Т.А., Костюкович Т.И. Автором лично были проведены планирование, организация, выбор моделей, составление программ и подготовка материалов, необходимых для доклинических исследований. Автор принял участие в планировании и подготовке материалов клинических исследований (протоколы исследований, брошюра исследователя, индивидуальная регистрационная карта, информация для добровольца и форма информированного согласия добровольца). Автором лично был осуществлен мониторинг за проведением исследований, систематизация первичных данных, статистическая обработка, и проведен анализ результатов исследований.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации. Достоверность результатов исследований, проведенных автором, подтверждена адекватным статистическим анализом данных, полученных в ходе независимых экспериментов. Основные результаты диссертационной работы доложены на следующих конференциях и встречах: первом конгрессе Евро-Азиатского

общества по инфекционным болезням (г. Санкт-Петербург, 1-3 декабря 2010 года); XVIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, 11-15 апреля 2011 года); IV международном научно-медицинском фестивале «Врач-Провизор-Пациент» (г. Санкт-Петербург, 15 - 16 сентября 2011 года); Всероссийском ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» (г. Санкт-Петербург, 5-6 октября 2011 года), World influenza congress Europe 2011 (Австрия, Вена, 6-8 декабря, 2011 года).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и 6 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 136-ти страницах машинописного текста, включая 16 таблиц и 26 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, четырех глав собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 220 источников, из них 65 источника являются отечественными и 155 – иностранными. Диссертация изложена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утверждёнными в ГОСТ Р 7.0.11–2011.

Внедрение результатов работы. На основании результатов проведенных исследований оформлена нормативная документация (фармакопейная статья предприятия, инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения), разработан регламент производства и зарегистрирована новая инактивированная субъединичная гриппозная вакцина в РФ (регистрационное удостоверение № ЛП-001836 от 13.09.2012 г.), а также получены разрешения Минздрава России на проведение дальнейших клинических исследований: № 160 от 7 марта 2013 г. - с участием лиц старше 60 лет; №550 от 2 октября 2014 г. – с участием детей с 6 месяцев; № 562 от

10 октября 2014 г. – с участием здоровых беременных женщин в возрасте 18-35 лет во II и III триместрах беременности.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Проблемы современной профилактики гриппа и пути дальнейшего развития

1.1.1. Роль вакцинопрофилактики в борьбе с гриппом

Грипп и острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) занимают первое место по частоте и количеству случаев заболеваний в мире и составляют до 90% всех инфекционных заболеваний (Зайцев, 2008). Так в России каждый год регистрируется порядка 27,3-47,0 млн. случаев респираторных инфекций (Петров, 2007). Смертность от гриппа и его осложнений занимает 1–е место среди всех инфекционных заболеваний (Зайцев и Синопальников, 2008). В 2 % случаев грипп требует стационарного лечения, инициируя в дальнейшем у 4-11 % госпитализированных больных развитие осложнений, которые могут приводить к летальному исходу (ACIP, 2007). При сердечнососудистой патологии летальность от гриппа возрастает в 52 раза, а при болезнях легких – в 120 раз (104 и 240 на 100 тыс., соответственно). Этот показатель возрастает до 435 на 100 тыс. у пациентов, у которых гриппозная инфекция развертывается на фоне сочетания сердечнососудистой патологии с патологией органов дыхания (Зайцев и Синопальников, 2008).

Актуальность борьбы с гриппом обусловлена, в первую очередь, его социальной значимостью и комплексом медицинских проблем - высокой частотой осложнений и инвалидизации. Кроме того, в настоящее время рассчитано, что заболеваемость гриппом ведет к колоссальным экономическим потерям, связанным с затратами на лечение и реабилитацию, а также с нетрудоспособностью и снижением производительности труда, вследствие чего идут потери прибыли как отдельными организациями, так и государством в целом. В России ежегодный суммарный экономический ущерб от гриппа оценивается экспертами в сумму, достигающую 40 млрд. руб. (Кузин и др., 2010).

Вакцинопрофилактика считается наиболее эффективным и экономичным мероприятием, направленным на охрану здоровья населения (Медуницын, 2004). В различных странах, включая Россию, вакцинация против гриппа нередко является финансируемым работодателем компонентом программ по укреплению здоровья сотрудников (Семенов, 2003; D'Heilly & Nichol, 2004) в связи с тем, что грипп может составлять 10–12 % от общего числа дней нетрудоспособности (Strunk, 2005). Вакцинация снижает частоту гриппоподобных заболеваний среди работников различных отраслей промышленности (Атьков и др., 2008; Dille, 1999; Mixeu et al., 2002; Morales et al., 2004; O'Reilly & Stevens, 2002; Samad et al., 2006).

Иммунизация против гриппа помогает снизить количество дней нетрудоспособности (абсентеизм) и презентеизм (выход на работу больного человека и работу со сниженной продуктивностью) (Атьков, О. Ю. И др., 2008; Abbas et al., 2006; Olsen et al., 2005). А также имеет доказанный экономический эффект (экономия от 73,92 до 188,42 рубля на одного привитого в ценах 2006 года) в исследовании в РФ (Атьков и др., 2008) и от 15 до 50 долларов США на одного привитого в зарубежных исследованиях (Abbas et al., 2006; Olsen et al., 2005). Среди в целом здоровых работников вакцинация может снизить заболеваемость респираторными инфекциями на 25–70 %, количество дней нетрудоспособности – на 43–80 %, количество посещений медицинских учреждений – на 44 % (Nichol et al., 1995).

В настоящее время в практике российского здравоохранения используются живые и инактивированные гриппозные вакцины (цельновирионные, расщепленные и субъединичные) (Лонская и др., 2014).

Инактивированные гриппозные вакцины вызывают в основном выработку антигемагглютинирующих и, в меньшей степени, антинейраминидазных антител. Основным механизмом защиты при их применении является выработка антигемагглютинирующих антител, которые обладают нейтрализующей активностью, что снижает тяжесть заболевания.

Доказано, что устойчивость к инфекции коррелирует с уровнем специфических IgG – антителами к гемагглютинину (НА). При титре менее 1:10 болеют 70 % людей, 1:40 – 1:60 – 29 %, при титре 1:80 – 6 % (Hannoun et al., 2004).

Механизм действия живых вакцин сложнее. Их применение индуцирует все звенья иммунного ответа (местного, клеточного и гуморального), а также формирует более широкий спектр защиты против дрейфовых вариантов вируса гриппа, чем инактивированные вакцины (Донина и др., 2003; Petukhova et al., 2012). К сожалению, данная вакцина имеет ряд противопоказаний и не применяться у беременных, детей младше 3 лет и лиц с иммунодефицитными состояниями. Для этих групп населения рекомендуется использовать субъединичные и сплит-вакцины (Медуницын, 2004). Эффективность, иммуногенность и реактогенность этих вакцин исследовали многократно в клинических и полевых испытаниях. При сравнительном мета-анализе более чем 6 000 исследований по иммуногенности и реактогенности расщепленных и субъединичных вакцин различий в иммуногенности обнаружено не было, но реактогенность оказалась несколько ниже у субъединичной вакцины (Beyer et al., 1998).

Если рассматривать эффективность инактивированных вакцин при совпадении вакцинных штаммов с циркулирующими в предупреждении развития заболевания, то она составляет более 70 % для здоровых людей младше 65 лет и 30-40 % для лиц старше 65 лет. Эффективность инактивированных вакцин в предупреждении смертельных исходов заболевания гриппом составляет 80 % даже среди такой группы риска, как люди старше 65 лет (Киселев и др., 2006; Покровский и Киселев, 2010).

В те годы, когда вакцинные вирусы не полностью совпадают с циркулирующими, эффективность вакцинации ниже, хотя она все еще способна обеспечить приемлемую защиту, особенно в отношении предотвращения тяжелого протекания заболевания и различных осложнений (Fiore et al., 2009). Недавние исследования показали, что во время пандемии гриппа и в те годы,

когда циркулирующие вирусы гриппа не совпадают с вакцинными, иммунизация сезонной противогриппозной вакциной в сочетании с пневмококковой вакциной может снизить смертность у пожилых (Mahamat et al., 2013).

Накоплено огромное количество данных, убедительно доказывающих целесообразность вакцинации против гриппа целевых групп, определенных Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) (ACIP, 2007) и ВОЗ (WHO, 2005), таких как: пожилые, дети младшего возраста и пациенты с хроническими заболеваниями. ВОЗ и Европейская Комиссия настоятельно рекомендуют обеспечивать противогриппозными вакцинами как минимум 75 % лиц из группы риска. Доказано, что вакцинация против гриппа позволяет снизить смертность и частоту осложнений в группах повышенного риска (Håberg et al., 2013; Mahamat et al., 2013; Mereckiene et al., 2008) и добиться позитивных значений соотношения затрат и положительного эффекта (Палаш , 1992).

Пожилые – одна из основных групп риска развития серьезных осложнений после гриппа (например, вторичная бактериальная пневмония) требующих госпитализации. В исследованиях не раз показывалось, что вакцинация пожилых часто приводит к экономической выгоде и снижению издержек (Гендон и Васильев, 2011; Cotes et al., 2012; Williams et al., 2012). В Италии анализ стоимости и эффективности вакцинации показал, что при иммунизации 66 % лиц ≥ 65 лет адъювантной противогриппозной вакциной, государство ежегодно экономит порядка 74 000 евро на госпитализацию и лечение гриппа (Iannazzo, 2011), а в Японии – 516 332 йен (Cai et al., 2006).

Вакцинация детей школьного возраста не только позволяет предупредить заболеваемость гриппом, но и является экономически эффективной мерой (Bhat-Schelbert et al., 2012; Jefferson et al., 2012; Vynnycky et al., 2008). Так анализ прямого (затраты на лекарственные средства и медицинскую помощь) и непрямого (потеря рабочих дней) экономического ущерба при заболевании детей гриппом в возрасте от 6 месяцев до 5 лет показал, что вакцинация детей

снижает затраты на лекарственные средства на 32 % и ущерб от потери рабочих дней на 33 % (Гендон, 2006).

Кроме того, вакцинация позволяет снизить риск постинфекционных осложнений. В качестве примера можно привести результаты, полученные итальянскими исследователями. Согласно их данным за 6 месяцев наблюдения в ходе эпидемического сезона, вакцинация позволила снизить число случаев острого воспаления среднего уха у 12–48–месячных детей на 33,8 % по сравнению с невакцинированными (Marchisio et al., 2008).

Особо остро стоит проблема профилактики гриппа у детей младше 6 месяцев, так как в настоящее время не существует вакцин для данного контингента. Для решения этой проблемы Комитет по инфекционным заболеваниям США рекомендовал вакцинировать против гриппа всех членов семьи и лиц, работающих в учреждениях с детьми до 6 месяцев (CDC, 2010).

В последнее время накапливаются данные, что вакцинирование адъювантными гриппозными вакцинами во II и III триместрах беременности защищает новорожденных от заболевания гриппом. Было показано, что материнские антитела, сформированные после иммунизации адъювантной вакциной, могут передаваться новорожденным, и сохраняться на протективном уровне около полугода (Zuccotti et al., 2010).

Подавляющее большинство здоровых, не пожилых взрослых, переносят грипп в легкой форме. В связи с этим, основная эффективность вакцинации данной возрастной группы, для государства в целом, в большей степени связана со снижением экономических потерь по причине отсутствия на работе и в меньшей степени – с профилактикой тяжелых и осложненных форм гриппа (Liu et al., 2004; Nichol et al., 1995).

С позиции работодателя вакцинация от гриппа приносит явный положительный экономический эффект. Если даже предположить, что все непривитые заболевшие сотрудники выйдут на работу, а их трудоспособность

снизится не более чем на 30 %, вакцинопрофилактика гриппа всё равно будет экономически оправданной (Атьков и др., 2008).

Несмотря на относительно хорошую эффективность существующих гриппозных вакцин, не прекращаются исследования с целью их улучшения. В частности для повышения их эффективности для лиц пожилого возраста, эффективности при однократной вакцинации в условиях пандемии, увеличения возможности защищать от дрейфовых вариантов вируса, а также способности индуцировать не только гуморальный, но и клеточный иммунитет (Гендон, 2007).

Хотя наряду с иммунизацией может проводиться химиопрофилактика, химиопрепараты не могут рассматриваться как альтернатива вакцинации (Петров, 2007) в связи с растущей резистентностью вирусов к препаратам, высокой стоимостью, необходимостью ежедневного приема, побочными эффектами, а также ограниченной доступностью этих средств при массовых вспышках инфекции (Киселев, 2012; Zhang et al., 2013).

Существует острая необходимость в разработке вакцин нового поколения с более широким охватом защиты, не только против дрейфовых вариантов вирусов сезонного гриппа, но и против субтипов, персистирующих у других млекопитающих и птиц, которые могут стать причиной развития пандемии в будущем. Таким образом, повышение эффективности гриппозных вакцин, особенно для групп риска – основное направление для исследований в области совершенствования мер по профилактике гриппа. Можно быть уверенными, что разрабатывая различные технологии повышения эффективности сезонных противогриппозных вакцин, мы одновременно занимаемся и решением многих проблем, связанных с производством препандемических и пандемических вакцин.

1.1.2. Проблемы обеспечения гриппозными вакцинами

Ключевым этапом при производстве сезонных гриппозных вакцин является определение штаммов вирусов типов А и В, которые с наибольшей вероятностью будут циркулировать в следующем эпидемиологическом сезоне. ВОЗ организовала всемирную систему надзора для мониторинга и тщательной характеристики циркулирующих вирусов гриппа. Ранее классические вакцинные штаммы вируса гриппа получали методом реассортации, теперь он замещается на более быстрый и эффективный метод обратной генетики, который был разработан в последнее десятилетие (Steel et al., 2010; Wang et al., 2010; Wei et al., 2010).

Кроме того, во всемирную систему надзора ВОЗ были введены новые методы: мониторинг в режиме реального времени и системы математического моделирования. Это позволяет не только более адекватно идентифицировать, визуализировать и сравнивать вновь появляющиеся дрейфовые варианты сезонного гриппа, но также оценивать антигенные различия между существующими и вновь появляющимися вирусами гриппа. Данные в режиме реального времени вносят огромный вклад в определение наиболее подходящих вакцинных штаммов (Russell et al., 2008; Russell et al., 2008; Smith et al., 2004).

В 2009 г. впервые в истории человечества безопасные и эффективные вакцины против пандемического вируса гриппа стали доступными в период пандемии, хотя для многих стран их поставка была уже слишком запоздалой. Так как несмотря на доступные технологии и внедренный план пандемической подготовки, до момента выпуска первых доз вакцин против пандемического вируса A(H1N1)pdm прошло более чем 6 месяцев, а процесс масштабирования производства потребовал еще большего времени (Garten et al., 2009).

Существует три ключевых момента, которые могут задерживать поставку вакцин против пандемического гриппа на фармацевтический рынок:

- время от момента идентифицирования пандемического вируса до создания вакцинного штамма;

- время, потраченное на доказательство эффективности и безопасности пандемических вакцин;

- производственные мощности.

Увеличение масштабов вакцинации является стратегически важным аспектом контроля пандемии. Новые технологии производства гриппозных вакцин включают использование перевиваемых клеточных линий, таких как MDCK, VERO и PERC-6. Кроме того, недавно стали разрабатываться подходы получения гемагглютинина (НА) вируса гриппа с использованием клеток растений или бакуловирусных систем. Все эти подходы повышают доступность производственного субстрата (Palache et al., 1997; Wang et al., 2010; Wei et al., 2010).

Не смотря на это, в настоящее время практически все инактивированные и живые вакцины производятся с использованием развивающихся куриных эмбрионов. Эта технология была разработана более 60 лет назад и до сих пор полностью не замещена на технологию с использованием клеточных культур (Palache et al., 1997).

Также необходимо переходить от исследований in vivo к исследованиям in vitro. В настоящее время абсолютное большинство доклинических исследований новых гриппозных вакцин проводят на животных моделях (мышах, хорьках, макаках), что лимитирует время поставки на рынок новых актуальных вакцинных препаратов (Bodewes et al., 2010).

Всемирная производственная мощность для пандемических вакцин в значительной степени зависит от продукции сезонной противогриппозной вакцины, которая на данный момент составляет приблизительно 900 миллионов доз тривалентных гриппозных вакцин в год. Если использовать все эти мощности, то можно произвести около 2,7 миллиардов доз моновалентной вакцины (Wood, 2002).

Однако доказано, что однократное введение инактивированной вакцины, содержащей 15 мкг вирусного ГА потенциально пандемического штамма, не приводит к созданию достаточного протективного иммунитета. Так, в клинических исследованиях гриппозных вакцин против H5N1 было продемонстрировано, что для получения достаточных титров необходима как минимум двукратная иммунизация (Wood, 2002).

Следует также отметить, что включение адъюванта в состав вакцины позволяет сократить количество антигена и кратность вакцинаций, необходимых для создания достаточного протективного иммунитета. Данный эффект уже принес свои значительные плоды при последней пандемии (Degano et al., 1999; Kreijtz et al., 2009).

Таким образом, несмотря на то, что текущие производственные мощности достаточны для удовлетворения среднего ежегодного спроса на вакцины для профилактики гриппа, объем производства остается важнейшей проблемой при пандемиях (Kreijtz et al., 2009).

Еще одним важным моментом является настороженное отношение населения к вакцинации против гриппа. Несмотря на рекомендации ВОЗ, Европейской Комиссии и органов здравоохранения большинства стран о необходимости ежегодно проводить иммунизацию против гриппа хотя бы лиц групп повышенного риска, гриппозные вакцины остаются одними из наименее применяемых (Degano et al., 1999).

Возможные серьезные последствия этой парадоксальной ситуации можно проиллюстрировать на примере эпидемии 1989-1990 гг. Тогда, несмотря на то, что вызвавший эпидемию вирус гриппа (A/Шанхай/11/87 (H3N2)), был практически полностью идентичен вакцинному штамму, он унес жизни 26 000 человек в Великобритании, 55 000 в США и 4 100 в Нидерландах. Логично высказать предположение, что проведение массовой вакцинации против сезонного гриппа в соответствии с рекомендациями органов здравоохранения

большинства стран позволило бы избежать смертельного исхода во многих этих случаях (Degano et al., 1999).

В России охват населения прививками против гриппа до сих пор недостаточен, что не позволяет говорить о массовой вакцинации населения и формировании резистентной прослойки. Современная концепция вакцинопрофилактики гриппа ориентирована, прежде всего, на иммунизацию лиц высокого риска (WHO , 2005). Однако, в сезон 2009–2010 гг. в целом по стране против сезонного гриппа было привито около 34 млн. человек, что составляет 24 % от общей численности населения (Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010).

Поскольку в эпидемическом сезоне 2009–2010 гг. доминирующим стал вирус A/Калифорния/7/2009 (H1N1), вакцинация против которого стала возможной уже в разгар пандемии, и который вошел в состав трехвалентных сезонных вакцин, специалисты особенно подчеркивали необходимость проведения массовой вакцинации против сезонного гриппа. По данным отечественных исследователей, среди заболевших пандемическим гриппом вакцинацию от сезонного и/или пандемического гриппа отрицали все пациенты (Кузьмина и др., 2010). В другой работе из 153 заболевших 98 % больных не были привиты от гриппа (Убоженко и др., 2010).

Несмотря на все сложности и проблемы, связанные со своевременным реагированием и поставкой на фармацевтический рынок необходимого количества актуального вакцинного препарата, можно отметить ряд тенденций к улучшению сложившейся ситуации. Постепенно технология продукции вакцин на основе куриных эмбрионов замещается на технологии с использованием клеточных культур. С помощью метода обратной генетики можно ускорить процесс получения исходного вакцинного вируса. Недавно было показано, что новые адъюванты в составе вакцины повышают степень и длительность защиты, а также позволяют снизить дозу антигена и кратность вакцинации. Другие исследования показали, что гриппозные вакцины на основе

различных вирусных векторных систем также способствуют созданию широкой защиты. Ожидается, что эти подходы могут привести к созданию универсальных гриппозных вакцин, приводящих к широкой кросс-реактивности и более длительной защите (De Jong et al., 2000).

Задачи и стратегии путей совершенствования гриппозных вакцин разрабатывались экспертными комитетами в течение нескольких лет и кратко они сводятся к следующему:

1) включение в состав вакцин адъювантных систем для повышения эффективности вакцинации для контингентов со слабой иммунной системой, в первую очередь детей младшего возраста и пожилых;

2) разработка новых субстратов для выращивания вируса;

3) реализация антиген–сберегающей стратегии, при которой адекватный иммунный ответ обеспечивается меньшей дозой антигена;

4) повышение безопасности гриппозных вакцин, что даст возможность увеличить охват ежегодной вакцинацией населения для создания иммунной прослойки. Данные задачи частично реализованы в недавно разработанных лицензированных вакцинах (Wood, 2008).

Резюмируя данную главу, к сожалению, нужно признать, что грипп остается самым массовым инфекционным заболеванием с высокой смертностью, наносящим огромный экономический ущерб. Единственным научно обоснованным методом борьбы с гриппом является специфическая вакцинопрофилактика. Проведение вакцинации против гриппа, в первую очередь, необходимо среди групп с высоким риском заболевания гриппом, развития осложнений и летального исхода. Основными направлениями в разработке гриппозных вакцин являются:

1) разработка новых и усовершенствование уже существующих технологий производства вакцин;

2) уменьшение реактогенности и увеличение профиля безопасности вакцин для расширения круга вакцинируемых;

3) снижение содержания вирусного антигена в вакцинирующей дозе;

4) повышение иммуногенности.

Многие из этих задач можно решать введением в состав вакцины новых безопасных и эффективных иммуноадъювантов.

1.2. Адъюванты в составе гриппозных вакцин

Ранее главным направлением совершенствования гриппозных вакцин было повышение их безопасности. Именно поэтому, от цельновирионных вакцин был совершен переход к сплит-вакцинам, а от сплит-вакцин к субъединичным. Однако, высокая очистка антигенов привела к проблеме снижения иммуногенности гриппозных вакцин. В связи с этим начался активный поиск иммуноадъювантов (Покровский и Киселев, 2010).

Адъювант – вещество способное неспецифически усиливать иммунный ответ на антиген, введенный совместно с ним. Слово адъювант произошло от латинского adjuvare и означает помогать или усиливать (Audibert & Lise, 1993). Первые представления об адъювантах зародились еще в 1920 гг. в работах Ramon и Glenny (Glenny, 1921; Glenny & Allen, 1922; Ramon, 1924).

Адъюванты широко используются в ветеринарии для улучшения эффективности вакцин: создания кросс-реактивности, повышения уровня защиты и пролонгирования протективности. При этом у животных введение адъюванта не вызывает резкого повышения частоты или степени выраженности нежелательных явлений (Cox & Coulter, 1997).

К сожалению, несмотря на огромные успехи применения адъювантов в ветеринарии, в большинстве случаев из-за высокой токсичности они не могут быть использованы у людей (Batista-Duharte et al., 2013; Stewart-Tull, 2000). Поэтому, до внедрения на рынок фармацевтических препаратов вакцин с адъювантами, ранее не используемыми у людей, выгода от применения такого

адъюванта обязательно должна быть соотнесена с возможным риском развития нежелательных явлений.

Пандемия 2009 г. и угроза пандемии со стороны высокопатогенного штамма вируса гриппа птиц привели к возвращению интереса к разработке универсальной вакцины, которая бы могла обеспечивать хорошую кросс-реактивность с различными подтипами вируса гриппа. Такой кросс-протективный иммунитет может быть опосредован главным образом CD8+ цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ), которые узнают консервативные внутренние компоненты вируса, и кросс-реактивными антителами (Kreijtz et al., 2008; Plotkin & Dushoff, 2003; Ruben & Cox, 2011; Settembre et al., 2011; Weaver et al., 2011; Yasugi et al., 2013), что приведет к элиминации вируса на ранней стадии и снизит случаи заражения (Sui et al., 2011). К сожалению, существующие инактивированные вакцины не вызывают эффективной индукции ЦТЛ. Добавление адъювантов может способствовать повышению иммуногенности и эффективности вакцин (Fraser et al., 2007).

1.2.1. Производные алюминия

Первыми разрешенными адъювантами, входящими в состав вакцин для людей, были гидроксид и фосфат алюминия (в 1920-х гг.). Однако, согласно проведенным исследованиям, их применение в составе гриппозных вакцин не дает существенных преимуществ по показателям эффективности (Davenport et al., 1968; Potter, 1982; Skea & Barber, 1993).

Для субъединичных гриппозных вакцин гидроксид алюминия является слабым адъювантом. Механизм его действия в организме остается недостаточно исследованным. Депо антигена при подкожном введении гидроксида алюминия, как думали ранее, не создается (Лусс и Костинов, 2009). При сочетанном введении антигена с гидроксидом алюминия преимущественно происходит стимуляция Тх2 (Атауллаханов и Хаитов, 2011). Более того, под

влиянием гидроксида алюминия индуцируется интенсивная продукция ИЛ-4, который угнетает развитие Тх1, но способствует дифференцировке Тх2 (Cunningham et al., 2004). Хотя гидроксид алюминия активирует макрофаги и дендритные клетки, но стимуляции клеточного ответ не происходит, так как отсутствует продукция дендритными клетками ИЛ-12 и других цитокинов, которые способствуют активации Тх1 (MacDonald et al., 2001; Trinchieri, 2003).

Кроме отсутствия активации клеточно-опосредованного иммунитета к недостаткам гидроксида алюминия можно отнести, то, что он стимулирует синтез IgE и активатора медиаторов воспаления ИЛ-4. При фагоцитозе частиц гидроксида алюминия, происходит дестабилизация мембран. Другими словами он оказывает деструктивное действие на клетки ткани в области инъекции (Атауллаханов и Хаитов, 2011). С этими свойствами гидроксида алюминия связаны основные побочные эффекты его использования в вакцинах: местные воспалительные реакции, гнойные хирургические осложнения у детей (около 12,3 % детей, привитых вакцинами, содержащими гидроксид алюминия), аллергия, обострение и развитие атопических заболеваний, поствакцинальная гранулема. Специалисты особо подчеркивают, что при вакцинации сорбированными на гидроксиде алюминия вакцинами важную роль играют корректное проведение инъекций (положение иглы, глубина инъекции, взбалтывание осадка), а также характеристики гидроксида алюминия, которые сильно варьируют от партии к партии (Лусс и Костинов, 2009; Petrovsky & Aguilar, 2004).

1.2.2. Водно-масляные эмульсии

Считается, что использование водно-масляных эмульсий в качестве адъювантов способствует не только повышению иммуногенности вакцины (особенно при иммунизации пожилых лиц), но и, возможно, усиливает защиту от дрейфовых вариантов вируса гриппа. Кроме того, такие адъюванты

способны модулировать авидность, стимулировать клеточно-опосредованный иммунитет, позволяют снижать дозу антигена в вакцине. Основная трудность заключается в том, что по мере нарастания модулирующих свойств адъюванта, повышается и его токсичность, а так как основным требованием ко всем адъювантам является их полная безвредность для человека, многие адъюванты, показавшие положительный эффект на животных, не разрешается использовать у людей. Несмотря на эти трудности, на сегодняшний день уже зарегистрировано несколько гриппозных вакцин, содержащих в качестве адъюванта такие водно-масляные эмульсии, как MF59 и ASO3 (Chang et al., 2009; Morel et al., 2011; Wegmann et al., 2012).

1.2.2.1. MF59

MF59 – водно-масляная эмульсия, которая с 1997 г. используется для повышения иммуногенности сезонных, препандемических и пандемических инактивированных вакцин, сохраняя при этом их безопасность и хорошую переносимость. MF59 представляет собой микрокапельную водно-масляную эмульсию, состоящую из стабилизированных капель сквалена (2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракоза-2,6,10,14,18,22-гексаен) и двух сурфактантов (твин 80 и спан 85) (рис. 1). Одна доза адъюванта содержит: сквалина – 9,75 мг; твина 80 – 1,175 мг; спана 85 - 1,175 мг; цитрата натрия – 0,66 мг и лимонной кислоты – 0,04 мг (Rappuoli & Giudice, 2012).

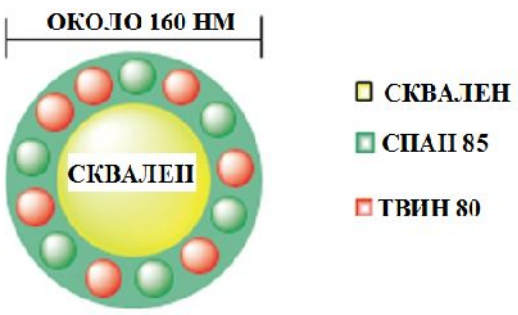


Рисунок 1 - Структура адъюванта MF59 (Tsai, 2013).

Средний размер частиц составляет 160 нм, что лишь в 1,5 раза больше вириона вируса гриппа (O'Hagan et al., 2011). Важно, что эмульсия обладает адъювантным эффектом только в сочетании с антигеном, т.е. ее раздельное введение с антигеном не приведет к адъювантному действию. Как известно, воспалительный ответ, возникающий в месте введения, вызывается нейтрофилами, моноцитами и макрофагами, которые секретируют хемокины, привлекающие все новые иммунореактивные клетки (Calabro et al., 2011; Seubert et al., 2008). Иммуностимулирующая окружающая среда активирует дендритные клетки, повышает их способность к захвату антигена и миграции в локальные лимфатические узлы, где встреча с Т-хелперами индуцирует сильный и быстрый CD4-клеточный ответ (Galli et al., 2009). При введении MF59 местные реакции кратковременны, так как адъювант удаляется из места введения в течение 6 часов (Ellebedy et al., 2011).

Во время последней пандемии в 2009 г. было показано, что трехвалентная субъединичная вакцина с MF59 способствовала активации предсуществующего клеточного иммунитета, стимулируя мононуклеарные клетки периферической крови не только к гомологичным антигенам, но и к гетерологичному новому A(H1N1)pdm, а также индуцировала развитие гуморального иммунного ответа за счет выработки антител к высококонсервативным участкам НА (Iorio et al., 2012). Данные некоторых работ показывают, что кросс-реактивность клеточного ответа против нового вируса уже существовала до его циркуляции и была вызвана иммунизацией сезонной вакциной, однако данный феномен был характерен только для взрослых. Кросс-реактивностью клеточного ответа можно, по крайней мере частично, объяснить низкую патогенность нового пандемического вируса (Hancock et al., 2009).

Афлунов – препандемическая моновалентная гриппозная вакцина A/H5N1 с адъювантом MF59. В доклинических исследованиях на кроликах была показана хорошая переносимость, отсутствие эмбриотоксичности и тератогенности. В клинических исследованиях на детях, взрослых и пожилых

также была показана безопасность и хорошая переносимость вакцины. Вакцина была высоко иммуногенна как против гомологичного, так и против гетерологичного вирусного штамма (Gasparini et al., 2012).

Однократное введение A(H1N1) вакцины с адъювантом MF59 приводило к достаточному уровню серопротекции у здоровых взрослых (в дозах 3,75 мкг и 7,5 мкг HA) и у здоровых пожилых (в дозе 7,5 мкг HA) людей. Введение второй дозы приводило в обоих случаях к ускорению достижения протективного уровня специфических антител (Hatz et al., 2012). Все это позволило зарегистрировать вакцину в январе 2011 г. (Gasparini et al., 2012).

Известно, что иммунный ответ у пожилых после вакцинации гриппозными вакцинами менее выражен по сравнению со здоровыми взрослыми (Sagawa et al., 2011). Снижение эффективности вакцинации у пожилых объясняется несколькими факторами, такими как снижение количества клеток Лангерганса, ограниченная способность дендритных клеток к презентации антигена, недостаточная экспрессия Toll-like рецепторов и снижение экспрессии MHC классов I и II. Кроме того, продукция Т-клеток в тимусе с годами снижается. Среди подходов, направленных на повышение эффективности вакцин, наиболее доказанным является добавление адъювантов (Parodi et al., 2011).

Еще в 1997 г. было показано, что сезонная тривалентная вакцина с адъювантом MF59 способна обеспечить более длительный специфический гуморальный иммунитет у пожилых, а соответственно и более продолжительную защиту от гриппа (Martin, 1997).

В ряде исследований было показано, что данный адъювант способен также стимулировать образование антител более широкого спектра реактивности, что особенно важно, когда циркулирующие штаммы вируса не совпадают с вакцинными. Кроме того, повышается их аффинность (Khurana et al., 2010; Khurana et al., 2011).

Во многих исследованиях была показана хорошая переносимость гриппозной вакцины с адъювантом MF59 даже детьми в возрасте от 6 до 36 мес. Установлено, что адъювантные вакцины более эффективны, особенно в тех группах, где, как правило, наблюдают низкий иммунный ответ (Andrews et al., 2011; Scheifele et al., 2011; Vesikari et al., 2009; Vesikari et al., 2009).

В одном неконтролируемом исследовании было показано, что материнские антитела, сформированные после иммунизации адъювантной вакциной, передаются новорожденным, и в 81 % случаев протективный уровень специфических антител (> 1:40) сохранялся в течение 5 месяцев. Эти данные очень интересны, так как в настоящее время не существует зарегистрированных вакцин для детей младше 6 месяцев (Zuccotti et al., 2010).

При сравнении использования адъювантной вакцины с безадъювантной у беременных не было обнаружено никаких различий в исходе беременности (Rubinstein et al., 2013).

Хотя вакцина с адъювантом MF59 повышает частоту местных реакций. Наиболее распространенными нежелательными реакциями на введение противогриппозной вакцины с MF59 были: припухлость в месте инъекции и миалгия. Они были слабой степени и исчезали в течение нескольких дней (Schultze et al., 2008).

Недавно было показано, что развитие атопического дерматита может являться реакцией на введение инактивированной вакцины с MF59 (Hwang et al., 2012), так как адъювант приводит к повышению уровня IgE и влияет на процессы формирования иммунитета и воспаление (Mark et al., 1995; Nagel et al., 1979; Schultze et al., 2008).

1.2.2.2. ASO3

Другая водно-масляная эмульсия - ASO3, была одобрена для использования в препандемической H5N1 и пандемической H1N1 2009

вакцинах. В состав ASO3 входят сквален и α-токоферол, а также твин 80. В одной дозе адъюванта содержится: сквалена – 10,69 мг; α-токоферола – 11,86 мг и твина 80 – 4,86 мг. В целом механизм ее действия такой же, как и у MF59 (Dorrington & Bowdish, 2013; Rappuoli & Giudice, 2012).

Препандрикс – препандемическая вакцина против H5N1 – сплит-вакцина содержащая 10 % ASO3. Введение адъюванта позволило снизить количество антигена в вакцине при сохранении иммунного ответа, удовлетворяющего всем требованиям к данному типу вакцин (Baras et al., 2008; Carter & Plosker, 2008).

Ключевую роль при стабилизации пандемии имеет наличие гриппозных вакцин с кросс-иммуногенностью, что позволяет независимо от существующих различий между вакцинным и циркулирующим штаммами обеспечить быстрое развитие иммунитета к инфекции. Адъювант ASO3 усиливает эффективность пандемической вакцины и позволяет быстро сформировать кросс-клайд-реактивный иммунитет (через 7-14 дней) уже после однократного введения, который сохраняется на протяжении 14 месяцев, тогда как безадъювантная вакцина не вызывает иммунного ответа против гетерологичных штаммов (Carter & Plosker, 2008).

Проведенное в 2012 г. исследование на 81 серонегативном добровольце, инфицированном ВИЧ, показало недостаточную эффективность сплит-вакцины с адъювантом ASO3 для данной группы (Kelly et al., 2012). Тот же результат был получен и при вакцинировании данной группы вакциной содержащей MF59, несмотря на выработку специфических антител, их титр был значительно ниже, чем у здоровых добровольцев (Kajaste-Rudnitski et al., 2011).

С другой стороны, было показано, что введение детям даже одной дозы пандемической вакцины с адъювантом ASO3, индуцирует достаточный уровень антител к A/California/7/2009, который сохраняется на протяжении года после однократной вакцинации (Scheifele et al., 2011).

Исследование этой же вакцины в Англии также показало ее высокую иммуногенность. Однако вакцина была реактогенна, особенно для детей,

увеличивая риск повышения температуры. Кроме того, было показано повышение риска конвульсий у детей младше 10 лет в первые дни после введения второй дозы моновалентной сплит-вакцины H1N1 (2009) с адъювантом ASO3 (95% ДИ: 0.86-14.07) (Stowe et al., 2011).

Покраснение и другие местные реакции у детей младше 5 лет также чаще наблюдались после введения вакцины с адъювантом ASO3, чем после безадъювантной вакцины (Glica et al., 2011).

В Финляндии и Швеции наблюдали повышение риска развития нарколепсии у детей после иммунизации вакциной, содержащей ASO3 (Montastruc et al., 2011; Zarocostas, 2011). Было зарегистрировано около 250 случаев среди 20 млн. привитых детей (Miller et al., 2013). Повышение риска развития нарколепсии позднее было подтверждено и в Англии, где популяционный риск составил 1 случай на 57 500 доз – 1 случай на 52 000 доз (Stowe et al., 2011).

1.2.3. Полиоксидоний

В России был разработан синтетический иммуномодулятор – Полиоксидоний®, который включили в качестве адъюванта в состав субъединичной гриппозной вакцины (Гриппол®). Полиоксидоний – первый препарат нового класса синтетических полиэлектролитов, который представляет собой N-оксидированное производное полиэтиленпиперозина с высокой молекулярной массой (Крамарь и др., 2011). В основе механизма иммуностимулирующего действия полиоксидония — его активирующее влияние на фагоцитоз и антителообразование (Дьяконова и др., 2004). Помимо иммуномодулирующего эффекта полиоксидоний обладает детоксицирующими, антиоксидантными и мембранопротекторными свойствами, обусловленными его полимерной природой и рядом особенностей его химической структуры (Лебедев и др., 2010; Пинегин и Варфоломеева, 2010; Хаитов и Пинегин, 2000).

Включение полиоксидония в состав вакцины Гриппол позволило снизить количество антигена (по 5 мкг гемагглютинина серотипов A/H1N1 и A/H3N2 и 11 мкг серотипа B) (Лусс и Костинов, 2009). Однако имеются публикации, указывающие на недостаточную иммуногенность данной вакцины, главным образом, для лиц пожилого возраста (Бурцева и др., 2000; Ельшина и др., 1998).

1.2.4. Новые адъюванты

В настоящее время разрабатывают и испытывают несколько десятков новых адъювантов.

Так например, было показано, что добавление хитозана в качестве адъюванта к субъединичной пандемической вакцине, содержащей штамм вируса A/California/7/09 (H1N1), увеличивает иммуногенность вакцины в 8-16 раз и значительно усиливает протективность. По своей химической структуре хитозан относится к полисахаридам, мономером хитина является N-ацетил-1,4-b-D-глюкопиранозамин (рис. 2) (Gendon et al., 2012).

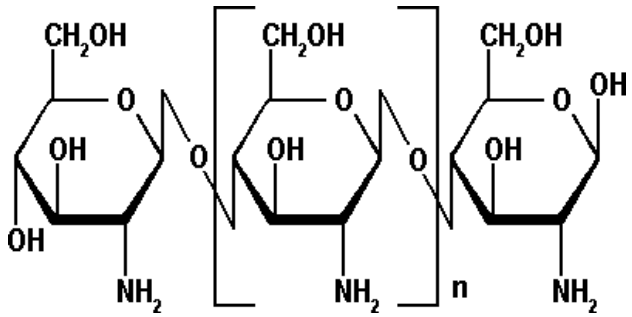
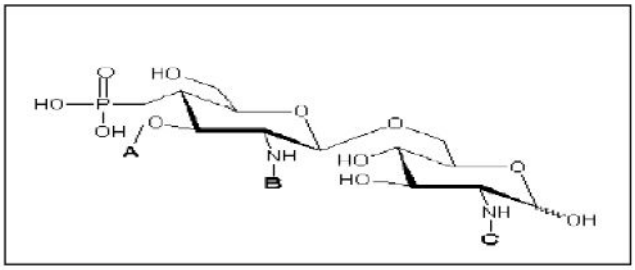


Рисунок 2 - Структурная формула хитозана (Gendon et al., 2012).

Не так давно на хорьках было проведено исследование адъювантного потенциала CpG-олигодеоксинуклеотида. Он эффективно повышал продукцию антител и ИФН I типа, а также активность ЦТЛ. Кроме того, CpG-олигодеоксинуклеотид активировал В-клетки, что приводило к секреции ИЛ-6 и IgM (Fang et al., 2010).

Использование вакцины, содержащей водно-масляную эмульсию в комбинации с синтетическим агонистом Toll-like рецепторов (Toll-like receptor,

TLR) - монофосфорил липид А (MPL) (рис. 3), показало усиление гуморального и клеточного иммунитета на животных моделях (мыши линий C57BL/6 и BALB/c, хорьки) к вирусу гриппа A/H5N1 (штаммы A/Vietnam/1203/2004 (клайд 1) и A/Indonesia/05/2005 (клайд 2.3)) по сравнению с безадъювантной вакциной (Clegg et al., 2012).



ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ	ЗВЕНО A	ЗВЕНО B	ЗВЕНО C
ГЕКСА-АЦИЛ	$C_{14}OC_{14}$	$C_{12}OC_{14}$	$C_{16}OC_{14}$
ПЕНТА-АЦИЛ	$C_{14}OC_{14}$	$C_{12}OC_{14}$	HOC_{14}
	HOC_{14}	$C_{12}OC_{14}$	$C_{16}OC_{14}$
	Δ-C_{14}	$C_{12}OC_{14}$	$C_{16}OC_{14}$
ТЕТРА-АЦИЛ	HOC_{14}	$C_{12}OC_{14}$	HOC_{14}
	Δ-C_{14}	$C_{12}OC_{14}$	HOC_{14}
	H	$C_{12}OC_{14}$	$C_{16}OC_{14}$

Рисунок 3 - Химическая структура MPL (http://www.allergytherapeutics.com/uploads/12147mpldec08151208.pdf).

Водно-масляные эмульсии часто используются при создании пандемических гриппозных вакцин, однако они имеют тот недостаток, что не вызывают мукозального иммунного ответа. Это стало причиной разработки новой водно-масляной эмульсии SP01, которую можно использовать как в инъекционных вакцинах, так и в интраназальных. SP01 состоит из сквалена, полимер простого эфира и касторового масла. В отличие от других водно-масляных эмульсий SP01 приводит к формированию мукозального иммунного ответа. Было показано, что SP01 способен усиливать выработку мукозальных и сывороточных антител, а также сдвигать иммунный ответ в сторону Tx1 при интраназальном введении мышам, демонстрируя при этом повышение уровня IgG2α и ИНФ-γ в спленоцитах. Также было отмечено позитивное повышение активности дендритных клеток (Yu et al., 2012).

Ваксфектин новый запатентованный катионный липидный адъювантный комплекс, его добавление к вакцинным препаратам приводит к значительному

повышению специфического иммунного ответа. Адъювант представляет собой смесь катионного липида (GAP-DMORIE) и нейтрального фосфолипида (DPyPE). При добавлении водного растворителя происходит их самосборка в липосомы (Smith et al., 2013).

Ваксфектин при добавлении к сезонной гриппозной вакцине усиливает как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ, в зависимости от соотношения адъюванта к антигену. Введение противогриппозной вакцины с Ваксфектином приводило к местному повышению ИФН-γ, ИЛ-6, Cxcl9, MCP-1, ФНО-α и CD247. Контролируя эти биомаркеры, можно подобрать оптимальное содержание адъюванта и антигена, чтобы направить иммунный ответ в сторону гуморального или клеточного, в зависимости от цели (Sullivan et al., 2010).

В 2011 г. было проведено исследование виросомальной вакцины с 50 мкг адъюванта Matrix M™ на 60 здоровых добровольцах. Matrix M™ представляет собой 40 нм наночастицы, в состав которых входят очищенная и охарактеризованная фракция сапонинов, холестерол и фосфолипид (Reimer et al., 2012). Вакцина была безопасной и хорошо переносилась добровольцами, однако включение в ее состав адъюванта приводило к повышению риска развития болезненности в месте введения. Вакцина с Matrix M™ приводила к развитию иммунного ответа, отвечающего всем требованиям EMEA, даже при содержании всего 1,5 мкг HA (Cox et al., 2011).

Коммерческие сезонные противогриппозные вакцины индуцируют продукцию антител преимущественно к HA (Nichol, 2008). Некоторые консервативные вирусные белки, такие как белки нуклеокапсида и белок M1, присутствуют в вакцине, но не иммуногенны. Для улучшения иммуногенных свойств в качестве адъюванта можно использовать наночастицы на основе вируса растений (например, вирус мозайки папайи, papMV), что повышает уровень и репертуар гуморального ответа к нуклеопротеину и к высококонсервативным регионам HA (Savard et al., 2011).

Наночастицы также инициируют клеточно-опосредованный иммунный ответ к белкам нуклеопротеина и белку М1 и обеспечивают долгосрочную защиту животных против гетерологических подтипов вируса гриппа (Carragher et al., 2008; Ito et al., 1991). Таким образом, сезонная гриппозная вакцина с papMV-наночастицами может индуцировать универсальную защиту против гриппа, что является преимуществом в условиях пандемии (Denis et al., 2007; Denis et al., 2008).

Кроме того PapMV-наночастицы усиливают Tx1 иммунный ответ к консервативным структурным белкам нуклеопротеина вируса гриппа, а также индуцируют высокий уровень ИФН-γ. Иммунный ответ на гриппозную вакцину с PapMV-наночастицами сохранялся на протяжении 10 месяцев после иммунизации (Savard et al., 2011).

Очищенный рекомбинантный нуклеопротеин вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (H1N1), продуцируемый в Escherichia coli, использовали в комбинации с адъювантом ISCOMATRIX (IMX), что приводило к индукции значительного гуморального и клеточного иммунного ответа у человека и животных (Pearse & Drane, 2005). IMX содержит сапонины (иммуностимулирующий компонент), холестерин и фосфолипиды. IMX – является системой доставки антигена, усиливает кросс-презентацию и индуцирует активацию $CD8^+$ Т-клеток и антиген-презентирующих клеток, пролонгирует презентацию антигена в дренируемых лимфатических узлах, а также индуцирует синтез ряда цитокинов и химокинов (Windon et al., 2001). Иммунизация рекомбинантным нуклеопротеином в сочетании с IMX приводила к значительному повышению продукции ИФН-γ. Добавление рекомбинантного белка вируса гриппа, например М1 или М2, может значительно улучшить эффективность IMX вакцин, без повышения стоимости (Pearse & Drane, 2005).

Суммируя литературные данные по настоящему разделу, можно заключить следующее: адъювант – субстанция, используемая в комбинации со специфическим антигеном, обеспечивающая формирование более выраженного иммунного ответа, чем сам антиген. Адъюванты могут работать в нескольких направлениях. Они повышают иммуногенность слабых антигенов, увеличивают скорость развития и длительность иммунного ответа, модулируют авидность, специфичность, распределение подклассов антител, стимулируют клеточно-опосредованный иммунитет, вызывают индукцию мукозального иммунитета, усиливают иммунный ответ у иммунологически незрелых или пожилых лиц, позволяют снизить дозу антигена в вакцине. Однако, при разработке адъювантов необходимо решать следующие серьезные задачи: адъювант не должен вызывать поликлональную стимуляцию, приводящую к перегрузке иммунной системы; усиливать реактогенность (местные и общие воспалительные реакции с формированием болезненных абсцессов, язвенных поражений); тератогенность и индукцию аутоиммунных процессов и др. В настоящее время спектр адъювантов одновременно удовлетворяющий всем требованиям по реактогенности, безопасности, переносимости и эффективности чрезвычайно узок. Поэтому разработка безопасных адъювантов, усиливающих иммуногенность вакцины и пролонгирующих ее действие, остается важной стратегией в развитии вакцинопрофилактики.

1.3. История изучения сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона (Совидон)

Еще в 1974-1978 гг. В.А. Кабанов, Р.В. Петров, Р.М. Хаитов и др. в экспериментах на животных обнаружили иммуностимулирующие свойства ряда линейных синтетических полиэлектролитов. Были исследованы поли-4-винилпиридин, поли-2-метил-5-винилпиридин, поли-4-винил-N-этилпиридиний бромид, полиакриловая кислота, сополимеры акриловой кислоты с

винилпирролидоном и их производные. Было установлено, что указанные полиэлектролиты стимулируют различные процессы в рамках иммунной системы: миграцию и взаимодействие Т- и В-лимфоцитов, продукцию антител в ответ на чужеродные антигены, функционирование NK-клеток и макрофагов (Хаитов, 2005).

Даже in vitro под влиянием полиэлектролитов усиливается синтез антител в ответ на чужеродный антиген, фагоциты активнее захватывают и переваривают микробные частицы, вырабатывают окислительные радикалы, с помощью которых они эффективно убивают микроорганизмы; лимфоциты переходят в начальную стадию клеточного цикла - фазу G1 (Хаитов, 2005). Под влиянием полиэлектролитов происходит стимуляция продукции антител к Т-зависимым антигенам даже в организме, дефицитном по содержанию Т-клеток (Хаитов, 2005).

Препарат Совидон – сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина был синтезирован методом радикальной полимеризации, который аналогичен методу, применяемому для синтеза поливинилпирролидона – синтетического полимера, широко используемого в медицине. Сополимер 2-метил-5-винилпиридин и N-винилпирролидона - это водорастворимый полимер, с средневязкостной молекулярной массой M_η=30000÷55000 дальтон, нетоксичный, обладающий иммуностимулирующим действием (рис. 4) (Кедик и др., 2011; Кедик и др., 2012).

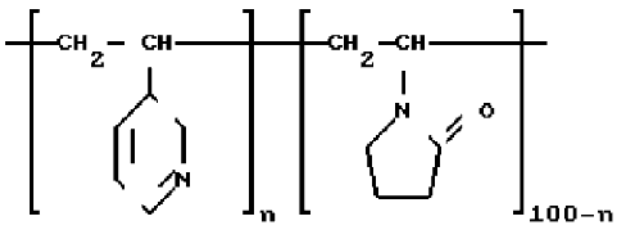


Рисунок 4 - Структурная формула сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона (Совидон), где n – число звеньев n = 39 ± 3 (Кедик и др., 2011)

В опытах на грызунах, собаках, обезьянах, овцах и свиньях были изучены фармакологическая активность, безвредность и противолучевая эффективность

сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона (Совидон). Данные, полученные в ходе системной оценки генетической активности препарата Совидон, свидетельствовали об отсутствии у него мутагенных и канцерогенных свойств (Калистратов и др., 1993). Было также показано, что Совидон в дозах до 100 мг/кг не оказывает эмбриотоксического действия и не нарушает репродуктивную функцию крыс и кроликов. Кроме того, Совидон не оказывает влияния на функцию центральной нервной системы, имеет слабое сосудорасширяющее действие и несколько ослабляет сосудосуживающий эффект α-адреномиметиков (Калистратов и др., 1993). Препарат выводится главным образом через почки. Было показано, что данный препарат обладает широким спектром биологической активности – противоопухолевым, антибактериальным, противовирусным действием, а также тормозит аутоиммунные процессы и стимулирует кроветворение (Калистратов и др., 1993; Кедик и др., 1994; Кедик и др., 2011). На основании этих данных, можно с большой долей уверенности говорить о его высоком уровне безопасности для использования у человека.

Дальнейшие исследования показали, что сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона обладает свойствами активатора фагоцитоза. Введение данного соединения грызунам в дозах 5 и 50 мг/кг статистически достоверно повышало фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов на 15-45 % по сравнению с контролем в исследованиях с красителем нейтрофильным красным, а также увеличивало долю фагоцитирующих клеток на 8-23 %, а индекс завершенности фагоцитоза на 85-138 % в исследованиях с частичками коллоидной туши. В последнем случае, отмечалось, что введение сополимера, практически не изменяя числа фагоцитирующих клеток, в 1,5-2 раза увеличивало переваривающую способность макрофагов (Кедик и др., 2011).

Кроме того, было показано, что сополимер стимулирует выработку ИЛ-1α и ИЛ-1β. Одно из свойств обоих типов ИЛ-1 заключается в способности

стимулировать функциональную активность лимфоцитов в ходе развития иммунного ответа на воспаление и пролиферацию злокачественных клеток. ИЛ-1 также стимулирует костномозговое кроветворение и воздействует на функции фибробластов и эндотелиальных клеток (Кедик и др., 2011).

Первоначально препарат рассматривали и разрабатывали в качестве лечебного противолучевого средства. Многие исследования в России и за рубежом показали перспективность применения препаратов, обладающих выраженным иммуномодулирующим действием, таких как вакцинные препараты, иммуноглобулины, пептиды тимуса и костного мозга и др. в качестве радиопротекторов (Клемпарская и др., 1968; Петрович и др., 1971; Шведов и др., 1991). Считается, что радиопротекторное действие таких препаратов осуществляется за счет ликвидации иммунодефицита, вызванного радиационным излучением, и подавления канцерогенного эффекта ионизирующего излучения (Калистратова и др., 2001).

Противолучевая активность Совидона, в отличие от большинства других высокомолекулярных веществ, проявляется при внутримышечном способе введения и более выражена у крупных животных (млекопитающих), по сравнению с грызунами, что делало его еще более привлекательным для использования в качестве радиопротектора для человека. Совидон эффективен при остром и протяженном облучении в случае использования в течение суток после окончания радиационного воздействия (Кедик и др., 1996). Протективное действие Совидон оказывал не только при экстренном приеме, но и в отношении отдаленных последствий действия радиации на организм. Он снижал кумулятивную частоту возникновения опухолей молочной железы до нормального уровня в исследуемой популяции крыс и даже способствовал снижению агрессивности солидных опухолей молочных желез у крыс, индуцированных ^{131}I (Калистратова и др., 2001).

Противоопухолевое действие препарата Совидон было изучено на большом количестве перевиваемых опухолей. Так, он был эффективен в

отношении саркомы Иенсена, саркомы М-1, саркомы-45, карциносаркомы Уокер и тормозил опухолевый рост на 47-54 % (Кедик и др., 2000).

Исходя из всего вышеперечисленного, предполагалось, что препарат будет хорошим профилактическим средством для снижения онкопатологии в отдаленные сроки после внутреннего облучения (Калистратова и др., 2001).

Одновременно с проводящимися исследованиями по радиопротекции велись эксперименты, связанные непосредственно с иммуномодулирующими свойствами препарата Совидон. Перспективным казалось введение данного полимера в вакцины для повышения их эффективности и возможного снижения дозы антигена, что предположительно должно было снизить реактогенность.

Сам препарат даже при дозе 5000 мг/кг не вызывал гибели мышей F1(CBAxC57B1). При подкожном введении мышам 500 мг/кг отсутствовали признаки раздражающего действия препарата и выпадение волосяного покрова (Кедик и др., 1993).

В опыте по изучению миграционной активности колонии образующихся клеток селезенки с отрицательным контролем (физиологический раствор) и положительным контролем (продигиозан) было подтверждено, что Совидон обладает выраженным иммуномоделирующим действием (Кедик и др., 1993).

В доклинических исследованиях иммуностимулирующие свойства препарата были изучены в составе вакцин против сибирской язвы из штамма «55» (на телятах и овцах) и против классической чумы свиней (Кедик и др., 1993). При использовании препарата Совидон с сибиреязвенной вакциной удалось создать 100 % напряженный иммунитет, при этом прививочная доза спор была снижена в 250 раз. Комбинированное применение препарата Совидон и инактивированной вакцины против классической чумы свиней создавало напряженный иммунитет на 14 сутки после вакцинации и позволяло в 2 раза уменьшить дозу и кратность введения вакцины (Кедик и др., 1993). Кроме того, препарат Совидон обладал лечебно-профилактическим действием в

комплексе с антибиотиками и химиопрепаратами при лечении овец тетрациклином и стрептомицином от сибирской язвы (Кедик и др., 1993).

Такая богатая история изучения многочисленных свойств препарата Совидон - сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона - делает его крайне интересным и перспективным в качестве иммуноадъюванта в составе различных профилактических и терапевтических вакцин и препаратов, как против соматических, так и против инфекционных заболеваний.

Заключение

Грипп – острая вирусная инфекция, характеризующаяся интоксикацией и поражением слизистой оболочки верхних дыхательных путей. Вакцинация против гриппа является эффективным противоэпидемическим средством, однако вследствие постоянной смены антигенных свойств возбудителя требуется постоянный мониторинг и разработка новых вакцинных штаммов, соответствующих циркулирующим в человеческой популяции в каждый конкретный эпидемический сезон. Кроме того, в настоящее время ряд стран имеет ограниченные возможности по производству противогриппозных вакцин. Более того, поставки фактически всех развивающихся стран всецело зависят от внешней продукции. Простая технология, низкая стоимость продукта и широкий охват – идеальная характеристика противогриппозной вакцины нового поколения. Поэтому добавление адъювантов для повышения эффективности вакцин, снижения количества антигена в прививочной дозе и сокращения кратности введения выглядит очень привлекательно (Nichol & Treanor, 2006).

Использование безопасных, эффективных адъювантов, усиливающих протективные свойства вакцины, включая индукцию нейтрализующих антител против широкого спектра различных штаммов, является важной стратегией для разработки гриппозных сезонных вакцин, которые смогут обеспечивать

оптимальную защиту, даже в условиях несовпадения циркулирующих вирусов с вакцинными штаммами (Osterhaus et al., 2011).

В проведенных ранее доклинических исследованиях препарата Совидон были доказаны его безопасность и иммуномодулирующее действие. Введение его в актуальные для ветеринарии вакцины обеспечивало высокий иммунный ответ при снижении дозы антигена в несколько сот раза, а также снижении кратности иммунизации. Полученные данные позволяют рассматривать сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона (Совидон) в качестве адъюванта в составе вакцин для профилактики инфекционных заболеваний у человека.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Институт экспериментальной медицины" (ФГБНУ «ИЭМ»).

2.1. Объекты исследования

В ходе проведения доклинических исследований были использованы следующие материалы, представленные в таблице 1.

Таблица 1 -Материалы, используемые в доклинических исследованиях

№	Наименование материала исследования	Количество	Исследование
1.	**Препараты на доклинические исследования**		
1.1.	Вирионы вируса гриппа типов A(H1N1), A(H3N2) и B; Субъединицы вируса гриппа типа A(H1N1), типа A(H3N2) и типа B (НА A(H1N1) и A(H3N2) – по 5,0 ± 1,0 мкг; НА B - 11,0 ± 2,0 мкг); Адъюванты: Полиоксидоний® (500 мкг); Гидроксид алюминия (500 мкг); Совидон (500 и 250 мкг); Субъединицы вируса гриппа типов А и В с каждым адъювантом	В объеме 0,5 мл	Электронно-микроскопическое изучение
1.2.	Вакцина Совигрипп без мертиолята (Совидон 500 мкг и 250 мкг); Вакцина Совигрипп с мертиолятом (Совидон 500 мкг и 250 мкг); Вакцина Гриппол; Физиологический раствор; Совидон 250 мкг и 500 мкг	НА A(H1N1) и A(H3N2) – по 5,0 ± 1,0 мкг; НА B - 11,0 ± 2,0 мкг в объеме 0,5 мл	Изучение безопасности и иммуногенности
2.	**Лабораторные животные (N = 86 особей)**		
2.1.	Кролики породы Шиншилла (m = 2-2,5 кг)	6 особей	Изучение пирогенности

Продолжение таблицы 1

2.2.	Хорьки (m = 1,1-1,5 кг)	80 особей	Изучение безопасности и иммуногенности
2.3.	Беспородные мыши (m = 10-12 г)	132 особи	Изучение безопасности и антигенной активности
3.	**Биоматериалы лабораторных животных**		
3.1.1.	Кровь хорьков	188 проб	Изучение безопасности и иммуногенности
3.1.2.	Кровь мышей	132 пробы	Изучение антигенной активности
3.1.3.	При патоморфологическом исследовании изучали: легкие, сердце, селезенку, печень, головной мозг, слизистую тонкого кишечника	от 80 особей	Изучение безопасности и иммуногенности

В ходе проведения клинического исследования (КИ) были использованы следующие материалы, представленные в таблице 2.

Таблица 2 - Материалы, используемые в клиническом исследовании

№ п/п	**Наименование материала исследовани**	**Количество**	**Исследование**
1.	**Препараты (N = 330 доз)**		
1.1.	Вакцина Совигрипп с консервантом	30 доз	I этап КИ
		80 доз	II этап КИ
1.2.	Вакцина Совигрипп без консерванта	30 доз	I этап КИ
		80 доз	II этап КИ
1.3.	Вакцина Гриппол	80 доз	II этап КИ

Продолжение таблицы 2

1.4.	Физиологический раствор для инъекций 0,9 %	30 доз	Плацебо (I этап КИ)
2.	**Объекты наблюдения (N = 330 человек в возрасте 18-60 лет (серонегативные по A(H1N1), A(H3N2) и B))**		
2.1.	Мужчины	40 человек	I этап КИ
		86 человек	II этап КИ
	Женщины	50 человек	I этап КИ
		154 человека	II этап КИ
3.	**Биоматериалы добровольцев**		
3.1.	Кровь добровольцев (N = 1320 проб)		
3.1.1.	Мужчины	160 проб	Гематологический, биохимический, серологический анализы и определение общего IgE на I этапе КИ
		344 проб	Тоже на II этапе КИ
3.1.2.	Женщины	200 проб	Гематологический, биохимический, серологический анализы и определение общего IgE на I этапе КИ
		616 проб	Тоже на II этапе КИ

Продолжение таблицы 2

3.2.	Моча добровольцев (N = 990 проб)		
3.2.1.	Мужчины	120 проб	Проведение общего анализа мочи на I этапе КИ
		258 проб	Проведение общего анализа мочи на II этапе КИ
3.2.2.	Женщины	150 проб	Проведение общего анализа мочи на I этапе КИ
		462 проб	Проведение общего анализа мочи на II этапе КИ
4.	**Документация по каждому добровольцу**		
4.1.	ИРК, Дневники самонаблюдения добровольцев (по N = 330 шт.)		
4.1.1.	Мужчины	по 40 шт.	I этап КИ
		по 86 шт.	II этап КИ
4.1.2.	Женщины	по 50 шт.	I этап КИ
		по 154 шт.	II этап КИ
4.2.	Амбулаторные карты (N = 330 шт.)		
4.2.1.	Мужчины	40 шт.	I этап КИ
		86 шт.	II этап КИ
4.2.2.	Женщины	50 шт.	I этап КИ
		154 шт.	II этап КИ

Вакцинные штаммы

Для изготовления экспериментальных серий гриппозной вакцины использовали следующие вакцинные штаммы, полученные из NIBSC (National Institute for Biological Standard Control Serum, Англия). В доклинических исследованиях:

- А/Брисбен/59/07 IVR-148 A(H1N1);
- A/NYMC X-175C (H3N2), подобный А/Уругвай/716/2007 и А/Брисбен/10/07 A(H3N2);
- B/NIB-58, подобный В/Брисбен/60/08.

В клинических исследованиях:

- А/Калифорния/07/09 A(H1N1)pdm09;
- А/Висконсин/15/09 A(H3N2);
- В/Брисбен/33/08.

Адъюванты

В качестве адъювантов инактивированной сезонной гриппозной вакцины использовали: алюминия гидроксид («Brenntag Biosector», Дания), Полиоксидоний® («Группа Компаний Петровакс», г. Москва) – Mr = 60 000 – 100 000 Да, сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N – винилпирролидона (Совидон) (ЗАО «Институт фармацевтических технологий», г. Москва) - Mr = 46 000 – 60 000 Да.

Исследуемые препараты

На основе вакцинных штаммов было разработано несколько экспериментальных серий вакцин, в том числе и бесконсервантных, содержащих различные адъюванты.

В одной прививочной дозе (0,5 мл) во всех экспериментальных сериях содержалось: гемагглютинин вируса гриппа подтипов A(H1N1) и A(H3N2) – по 5,0 ± 1,0 мкг; гемагглютинин вируса гриппа типа В – 11,0 ± 2,0 мкг, а также 85 -

115 мкг/мл мертиолята (за исключением серии без консерванта). Содержание адъювантов в экспериментальных сериях вакцин: алюминия гидроксид – 500 мкг; Совидон – 500 или 250 мкг.

В качестве препарата сравнения была выбрана полимер-субъединичная тривалентная вакцина Гриппол, применяемая в России для массовой иммунизации населения против сезонного гриппа. На 1 прививочную дозу (0,5 мл) вакцины Гриппол приходится: гемагглютинин вируса гриппа подтипов A(H1N1) и A(H3N2) – по 5,0 ± 1,0 мкг; гемагглютинин вируса гриппа типа В - 11,0 ± 2,0мкг; Полиоксидоний - 500 мкг; консервант – мертиолят (85-115 мкг/мл).

В качестве плацебо использовали физиологический раствор для инъекций 0,9 %.

Все препараты производились на филиале ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России в г. Уфа «Иммунопрепарат».

2.2. Методы исследования

2.2.1. Биохимические методы

2.2.1.1. Электрофорез в полиакриламидном геле

Чистоту и спектр антигенов, входящих в состав экспериментальных гриппозных вакцин, определяли методом электрофореза в 12 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДДС) в соответствии с методикой U.K. Laemmli (Laemmli, 1970) в невосстановленных и восстановленных условиях (толщина геля 0,75 мм) с последующей окраской геля Кумасси ярко-голубым R-250. Восстановленные условия отличались тем, что дополнительно использовали восстанавливающий агент – β-меркаптоэтанол. В испытаниях использовали полуфабрикаты вакцин без стабилизаторов, консервантов и других компонентов, входящих в состав лекарственной формы. Образцы в концентрации 1 мг/мл разводили равным

объемом буфера для нанесения и кипятили при 95 ^{o}C в течение 5 мин на водяной бане. В штрек вносили 20 мкл образца (10 мкг белка). Для полного выхода белка электрофорез проводили в денатурирующих условиях – в присутствии детергента и при кипячении пробы. Все буферы содержат 0,1 % ДДС. Условия электрофореза (12% ДДС-ПААГ) представлены в таблице 3, состав буфера для нанесения – в таблице 4, а для десятикратного электродного буфера – в таблице 5.

Таблица 3 -Условия электрофореза (12% ДДС-ПААГ)

	Разделяющий гель (объем)	Концентрирующий гель (объем)
Акриламид	6 мл	0,8 мл
Дистиллированная вода	5,8 мл	3,6 мл
1,875 М Трис-HCl (pH 8,8)	3 мл	1,25 М Трис-HCl (pH 6,8) 0,5 мл
ДДС 10%	150 мкл	50 мкл
Тетраэтилметилендиамин	7,5 мкл	5 мкл
Персульфат аммония 10%	50 мкл	17 мкл

Таблица 4 -Буфер для нанесения

	Объем/количество (в мл или мг, г)
1,25 М Трис-HCl (pH 6,8)	2,5 мл
ДДС	1 г
Глицерин 87 %	5,8 мл
Бромфеноловый синий	5 мг
β-меркаптоэтанол (для восстанавливающего электрофореза)	2,5 мл
Дистиллированная вода	35 мл (довести общий объем до 50 мл водой)

Таблица 5 -10х Электродный буфер

	Количество (в мл или мг, г)
Трис	30,3 г
Глицин	144,2 г
ДДС	10 г
довести до 1 л, pH должен быть 8,3	

2.2.2. Вирусологические методы

2.2.2.1. Электронная микроскопия методом негативного контрастирования

Все материалы, содержавшие биологические структуры (вирионы или субъединицы вируса) перед проведением электронной микроскопии подвергались диализу для удаления содержавшейся в них сахарозы с целью улучшения контраста и получения качественного изображения. Электронную микроскопию выполняли методом негативного контрастирования по стандартной методике (Шиммель, 1972).

Процедуру диализа проводили в течение 18 ч при температуре 4 ^{o}C против 0,015 М фосфатно-солевого буферного раствора (pH – 7,2).

Диализованный материал адсорбировали на медных сеточках, покрытых формваровой пленкой, стабилизированной углеродом, дополнительно промывали физиологическим раствором, содержавшим 0,5 % Twin 20, для удаления следов сахарозы и контрастировали 1 % фосфорновольфрамовой кислотой (pH 7,2).

Препараты, содержавшие только адъюванты, промывали физиологическим раствором без Twin 20 и контрастировали фосфорновольфрамовой кислотой (pH – 7,2).

Препараты исследовали в электронном микроскопе JEM 100-CX (JEOL, Япония) методом негативного контрастирования при инструментальном увеличении 5800 – 58 000 х, напряжении 80 кВ и апертурной диафрагме 50 мкм.

Фотографирование производили на специализированную фотопленку Agfa (Германия).

2.2.3. Методы работы с лабораторными животными

2.2.3.1. Оценка безопасности и иммуногенности экспериментальных гриппозных вакцин на мышах

Животные. Работа с животными проводилась в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (Минздрава РФ, 2003). Для изучения антигенной активности использовали беспородных белых мышей (m = 10 - 12 г). Лабораторные животные были получены из питомника лабораторных животных ГУП "Иммунопрепарат" Чишминского района республики Башкортостан.

Схема оценки безопасности и антигенной активности гриппозных вакцин in vivo. Мышам вакцины вводили внутримышечно двукратно по 0,5 мл с интервалом 7 суток. Мыши (n = 132) были распределены в 4 группы:

1 группа – вводили вакцину Совигрипп (Совидон 500 мкг) (n = 36);

2 группа – вводили вакцину Совигрипп (Совидон 250 мкг) (n = 36);

3 группа – вводили безадъювантную инактивированную гриппозную вакцину (n = 36);

4 группа – вводили однократно 0,5 мл физиологического раствора (n = 24).

Безопасность оценивали по прибавке массы тела, а также по поведению животных и их внешнему виду по сравнению с группой контроля. Взвешивание животных осуществлялось на электронных весах «V–600» высокого класса точности (ЗАО "Фартогосм", г. Санкт-Петербург) до введения препарата, на 7 и 14 сутки. Через 14 дней после повторной иммунизации мышей эвтанизировали передозировкой эфира и проводили тотальный забор крови из сонных артерий. Сыворотки мышей исследовались в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с гомологичными антигенами вакцины. Для постановки РТГА

использовали эритроциты кур. Парные сыворотки от каждого животного исследовали в одном опыте. Титр антител определялся в РТГА по МУ 3.3.2.1758-03.

2.2.3.2. Оценка безопасности и иммуногенности экспериментальных гриппозных вакцин на хорьках

Животные. Работа с беспородными хорьками (m = 1,1-1,5 кг) проводилась в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (Минздрава РФ, 2003) на базе вивария филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России – ВЦ».

Схема оценки безопасности и иммуногенности гриппозных вакцин in vivo. Хорьки, серонегативные к вакцинным штаммам, были распределены в 6 групп (n = 80):

- 1 группа – хорькам (n = 20) вводили вакцину Совигрипп (Совидон 500 мкг);
- 2 группа - хорькам (n = 20) вводили вакцину Совигрипп (Совидон 250 мкг);
- 3 группа - хорькам (n = 10) вводили препарат Совидон 500 мкг;
- 4 группа - хорькам (n = 10) вводили препарат Совидон 250 мкг;
- 5 группа - хорькам (n = 10) вводили препарат сравнения – вакцину Гриппол;
- 6 группа - хорькам (n = 10) вводили физиологический раствор.

Сыворотки крови лабораторных животных забирали для оценки уровня антител к гемагглютининам вирусов гриппа типа А и В до иммунизации, на 14 и 21 сутки после иммунизации. Перед проведением РТГА сыворотки обрабатывались рецептор-разрушающим энзимом - Receptor Destroying Enzyme (RDE). Постановку РТГА осуществляли по МУ 3.3.2.1758-03., используя куриные эритроциты, а также диагностикум гриппозный типа А (H1N1) для РТГА, штамм А/Брисбен/59/07 и диагностикум гриппозный типа В для РТГА,

штамм В/Астрахань/01/07 (ООО «ППДП», Россия) и маточный материал вируса гриппа А, штамм A/NYMC X-175 (H3N2).

На 21 сутки исследования животных подвергали эвтаназии путем внутримышечного введения раствора препарата «Золетил 100» в дозе 120 мг/кг в 0,12 мл до полного угнетения основных функций центральной нервной системы и проводили некропсию и гистологические исследования.

Гистологические исследования. Исследования проводились в филиале Федерального государственного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации» - «Вирусологический центр». Из исследуемых органов вырезали образцы (0,5х1,0х1,0 см) и на 24 ч погружали их в фиксирующий раствор (10 % раствор формальдегида). После фиксации образцы промывали проточной водой в течение нескольких часов. Для обезвоживания образцов использовали следующую последовательность спиртов – 70 %, 80 %, 96 % этанола. В 70 % и 80 % этаноле спирты выдерживались по 12 ч, в 96 % - 24 ч. Затем образцы уплотняли – чтобы в последующем их можно было резать на микротоме. В качестве уплотнителя использовался парафин. Из парафиновых блоков делали срезы толщиной 4-5 мкм. Срезы окрашивали стандартными методами: гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону (Волкова и Елецкий, 1982), и исследовали световой микроскопией. Гистологические исследования проводили у всех животных, которые были подвергнуты эвтаназии путем внутримышечного введения раствора препарата «Золетил 100».

2.2.3.3. Оценка пирогенности гриппозных вакцин на кроликах

Животные. Работа с животными проводилась в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (Минздрава РФ, 2003). Для оценки пирогенности использовали кроликов (n = 6, m = 2-2,5 кг). Лабораторные

животные были получены из питомника лабораторных животных ГУП "Иммунопрепарат" Чишминского района республики Башкортостан.

Схема оценки пирогенности гриппозных вакцин in vivo. Исследование проводили согласно методике описанной в XII Государственной фармакопеи РФ (часть I). Препарат признают пирогенным если сумма максимальных повышений температур у трех кроликов $\sum\Delta t$ больше 1,2 ºС, а индивидуальное повышение температуры - 0,5 ºС.

Перед опытом, с интервалом не менее 30 мин, у каждого кролика дважды измеряли температуру тела. Если различия в показаниях температуры у одного и того же животного превысило 0,2 ^{0}С, его исключают из исследования. За исходную температуру принимали величину последнего результата измерения.

Одну дозу (0,5 мл) испытуемых вакцин вводили в ушную вену кроликов. Ректальную температуру у кроликов измеряли до и после инъекции с точностью до 0,1 ^{0}С. Термометр вводили в прямую кишку кролика на глубину 5-7,5 см. За 18 ч до испытания кроликов лишали корма без ограничения воды. Температуру после введения вакцин измеряли с интервалом не более 30 мин на протяжении трех часов.

2.2.4. Иммунологические методы для оценки показателя иммунного ответа

2.2.4.1. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

Обработка сывороток. Перед постановкой реакций гемагглютинации, микронейтрализации для удаления неспецифических ингибиторов вируса гриппа сыворотки обрабатывали препаратом RDE (receptor–destroying enzyme производства Denka–Seiken, Tokyo, Japan) согласно протоколу производителя.

Постановка РТГА. Реакцию РТГА проводили в соответствии с методическими указаниями по определению показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа по МУ 3.3.2.1758-03. Парные сыворотки от каждого животного исследовали в

одном опыте. Готовили серию двукратных разведений сывороток на ФР (от 1:10 до 1:1280) в объеме 50 мкл. Для этого в 8-лунок каждого ряда вносили по 50 мкл ФР. В первую лунку вносили 50 мкл исследуемой сыворотки, разведенной в 10 раз и прогретой при 56 °С, и после 3-х кратного перемешивания, переносили 50 мкл разведенной сыворотки в следующую лунку, процедуру повторяли, титруя сыворотку, из последней (8-ой) лунки избыток (50 мкл) разведенной до 1:1280 сыворотки, сбрасывали. К каждому разведению сыворотки добавляли по 50 мкл (4 ГАЕ) стандартизованного гриппозного антигена. Панели встряхивали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого в каждую лунку, включая контрольные (по 100 мкл ФР), добавляли по 100 мкл 0,5 % куриных эритроцитов.

Учет результатов. Результаты реакции учитывали после оседания эритроцитов в контрольных лунках планшета (через 30-40 мин). Титром вирусспецифических антител в сыворотке считали ее наибольшее разведение, при котором наблюдается полная ингибиция агглютинации эритроцитов в результате взаимодействия вируса со специфическими антителами.

2.2.5. Клинические исследования

В рамках данной работы по конструированию и изучению безопасности и эффективности новой адъювантной гриппозной вакцины были проведен широкий спектр исследований, в том числе клинические исследования.

Клиническое исследование гриппозной вакцины Совигрипп (с Совидоном) проводились в 2010-2011 гг. в соответствии с Федеральным законом Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. N 61-ФЗ "Об обращении лекарственных средств", приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. «Правила клинической практики в Российской Федерации», национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р52379-2005 «Надлежащая клиническая практика», согласно Европейским предписаниям по GCP и

Хельсинской Декларации и протоколу, одобренному Комитетом по Этике и ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России. На проведение клинического исследования от Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации было получено разрешение № 28 от 10 декабря 2010 г.

Клиническое исследование вакцины Совигрипп проводилось на базах аккредитованных Росздравнадзором клинических центрах:

1. ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития России, Отделение апробации новых клинических технологий и препаратов (г. Санкт-Петербург);

2. ГОУ ВПО ПГМА им. академика Е.А. Вагнера (г. Пермь).

Оценка переносимости, реактогенности, безопасности и иммуногенности проводилась в рамках простого слепого рандомизированного многоцентрового исследования. Клиническое исследование было проведено в два этапа. На первом этапе изучали переносимость, реактогенность и безопасность вакцины Совигрипп на ограниченном контингенте добровольцев в возрасте от 18 до 60 лет (90 добровольцев), которые были рандомизированы в три группы: одна контрольная (плацебо), две другие получали исследуемые вакцины (с консервантом и бесконсервантную форму). На втором этапе исследовали переносимость, реактогенность, безопасность и иммуногенность - на расширенном контингенте добровольцев в возрасте 18 – 60 лет (240 добровольцев), которые были рандомизированны в три группы: две получали исследуемую вакцину Совигрипп (с консервантом и бесконсервантную форму), группа сравнения получала коммерческую вакцину Гриппол. В исследование приняли участие добровольцы, у которых величина титра специфических антител ко всем трем вакцинным штаммам был не выше 1:20.

Реактогенность и безопасность гриппозных вакцин оценивали по витальным показателям (артериальное давление, частота сердечных сокращений, температура тела), результатам неврологического осмотра,

данным лабораторных анализов (общий анализ мочи, общий и биохимический анализ крови, IgE) и нежелательным явлениям (местные и системные реакции).

Оценку местных и системных реакций проводили согласно МУ 3.3.2.1758-03 «Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа».

К системным реакциям относили повышение температуры тела, недомогание и др. К местным реакциям – болезненность, гиперемия и развитие инфильтратов в месте инъекции.

Наличие температуры до 37,5º С включительно расценивали как слабую реакцию, от 37,6º до 38,5ºС включительно – как среднюю, от 38,6º С и выше – как сильную.

Покраснение без инфильтрата диаметром до 50 мм на месте прививки или инфильтрат диаметром до 25 мм расценивали как слабую местную реакцию, красноту диаметром более 50 мм или инфильтрат диаметром 26 – 50 мм – как среднюю, инфильтрат более 50 мм в диаметре – как сильную местную реакцию.

Безопасность также оценивали лабораторно-инструментальными методами по показателям общего анализа крови (гемоглобин, эритроциты, лейкоциты, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, лимфоциты, моноциты, тромбоциты, СОЭ), общего анализа мочи (удельный вес, pH, белок, билирубин, глюкоза, эритроциты, лейкоциты) и биохимического анализа крови (С-реактивный белок, мочевина, АЛТ, АСТ, общий белок, щелочная фосфотаза), а также определения уровня суммарного IgE в сыворотке крови. Забор материала для исследования проводили до вакцинации, на 7 и 21 дни исследования.

Иммуногенность инактивированных вакцин оценивали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) по фактору сероконверсии, величине среднегеометрического титра (СГТ), уровням сероконверсии и серопротекции в сыворотках крови привитых в соответствии с критериями CPMP EMEA (2001 г.) и МУ 3.3.2.1758-03 (табл. 6, 7) до вакцинации и на 21 день после вакцинации.

Таблица 6 - Критерии иммуногенности гриппозных вакцин (возрастная группа 18-60 лет) (CPMP EMEA, CPMP/EWP/1045/01)

Критерии иммуногенности	**Значения**
Фактор сероконверсии (повышение средних геометрических титров антител на 21 день по сравнению с исходным уровнем), выражен в кратности увеличения	Более 2,5
Уровень сероконверсии (отношение количества добровольцев, у которых титр антител повысился более чем в 4 раза по сравнению с исходным уровнем, и, у которых на 21 день титр не менее 1:40)	Более 40 %
Уровень серопротекции (процент лиц, у которых титр антител более 1:40 на 21 день после вакцинации)	Более 70 %

Таблица 7 - Критерии иммуногенности гриппозных вакцин для взрослых, утвержденные Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (МУ 3.3.2.1758-03)

Критерии иммуногенности (взрослые от 18 до 55 лет)	**Вакцинный штамм вируса гриппа**	
	Тип А	**Тип В**
Величина титра антител до вакцинации	≤ 1:20	≤ 1:20
Вакцина должна вызывать прирост гомологичных антител в крови в 4 и более раз после однократного введения вакцины	70 % и более	60 % и более

Определение концентрации IgE в сыворотках крови добровольцев

Концентрацию IgE оценивали в иммуноферментном анализе с использованием набора «IgE общий-ИФА-БЕСТ» (Вектор-Бест ЗАО, Россия), предназначенного для определения концентрации общего IgE в сыворотки крови. Чувствительность – 2,5 МЕ/мл. Диапазон измерений: 0 - 750 МЕ/мл.

Постановка РТГА

Реакцию РТГА проводили в соответствии с методическими указаниями по определению показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа по МУ 3.3.2.1758-03. Сыворотки крови

предварительно обрабатывались рецептор-разрушающим энзимом - Receptor Destroying Enzyme (RDE), производства японской фирмы Denka Seiken Co. К 0,1 мл сыворотки добавляли 0,3 мл восстановленного в физиологическом растворе RDE. Смесь инкубировали при 37 ^{0}С в течение ночи (18 - 20 ч) при перемешивании. Обработанную сыворотку прогревали на водяной бане при 56 ^{0}С в течение 30 – 60 мин. Чтобы получить разведение 1:10 к прогретой сыворотке добавляли 0,6 мл физиологического раствора. Сыворотки, полученные в ходе скрининга и на 21 день, после вакцинации, исследовали в одном опыте. Готовили серию двукратных разведений сывороток (от 1:10 до 1:1280) в объеме 50 мкл. Для этого в 8 лунок каждого ряда вносили по 50 мкл физиологического раствора. В первую лунку вносили 50 мкл исследуемой сыворотки, разведенной в 10 раз и прогретой при 56 ^{0}С, и после 3-х кратного перемешивания переносили 50 мкл разведенной сыворотки в следующую лунку, процедуру повторяли, титруя сыворотку. Из последней (8-ой) лунки избыток (50 мкл) разведенной до 1:1280 сыворотки сбрасывали. К каждому разведению сыворотки добавляли по 50 мкл (4 ГАЕ) стандартизованного гриппозного антигена. Панели встряхивали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого в каждую лунку, включая контрольные, добавляли по 100 мкл 0,5 % куриных эритроцитов. Результаты реакции учитывали после оседания эритроцитов в контрольных лунках планшета (через 30 – 40 мин).

Все операции по взятию и обработке потенциально инфекционных клинических материалов проводили в одноразовых перчатках и масках, после использования материалы и контактировавшая с ними лабораторная посуда подлежала обработке 6 % раствором перекиси водорода в течение 4 ч.

Титром вирусспецифических антител в сыворотке считали ее наибольшее разведение, при котором наблюдается полное ингибирование агглютинации эритроцитов в результате взаимодействия вируса со специфическими антителами.

2.3. Статистическая обработка данных

Для создания базы данных была использована программа MS Excel. Статистическая обработка данных проводилась с использование параметрических и непараметрических критериев на персональном компьютере с помощью компьютерной программы Statistica 6.0 компании StatSoft. Выбор методов статистической обработки был обусловлен характером распределения изучаемых признаков (проверка по критерию Шапиро-Уилка) и типом данных. Для представления полученных данных использовали следующие показатели описательной статистики: среднее арифметическое, стандартное отклонение, среднегеометрические титры. Оценка статистической значимости различий проводилась с применением параметрических (критерий Стьюдента, дисперсионный анализ) и непараметрических (критерий Манна-Уитни, критерий Краскела-Уоллиса) критериев. Во всех процедурах статистического анализа нулевые гипотезы (H_0) не отвергались на уровне значимости $\alpha > 0,05$ и отвергались на уровне значимости $\alpha < 0,05$. За исключением случаев попарного сравнения, где для преодоления проблемы множественных сравнений была применена поправка Бонферрони, понижающая уровень значимости. В этом случае нулевые гипотезы (H_0) не отвергались на уровне значимости $\alpha > 0,05/к$ и отвергались на уровне значимости $\alpha < 0,05/к$ (1), где к – количество сравнений, вычисляемые по формуле $к = (n(n-1))/2$ (2), где n - количество групп. 95% доверительный интервал для пропорций в процентах при 5% уровне значимости ($\alpha \leq 0,05$) рассчитывали по формуле:

$$p \pm 1,96 \times \sqrt{\frac{p(100-p)}{n}}, \qquad (3)$$

где p - процент индивидуумов в выборке с интересующими нас свойствами;

n – размер выборки.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Анализ полипептидного состава концентратов экспериментальных гриппозных вакцин

Для определения чистоты и спектра антигенов, входящих в состав экспериментальной гриппозной вакцины, применяли метод вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в невосстановленных и восстановленных условиях (Laemmli, 1970). Для создания восстановленных условий использовали – β-меркаптоэтанол, который восстанавливает S-S связи, что приводит к разделению полимеров (агрегатов, тетрамеров, димеров) на мономеры. Таким образом, например из гемагглютинина вируса гриппа можно выделить две субъединицы HA_1 и HA_2.

Данные по полипептидному составу концентратов субъединиц вируса гриппа различных субтипов представлены на рисунках 5 - 7.

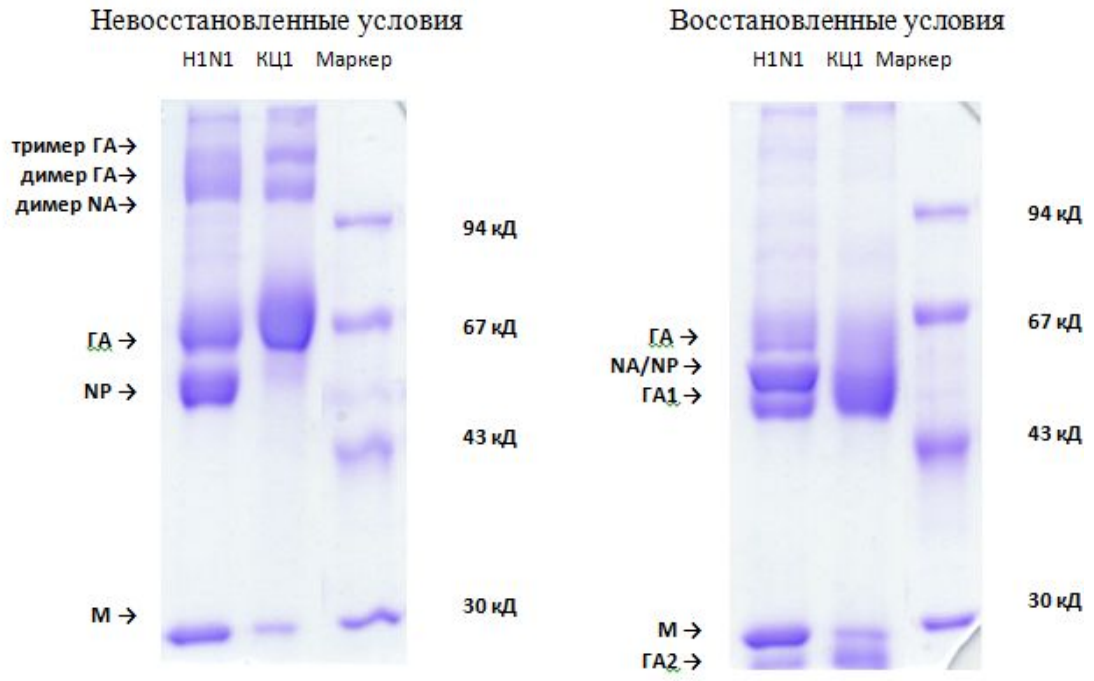


Рисунок 5 - Полипептидный состав концентрата субъединиц вируса гриппа подтипа A(H1N1), где H1N1 – концентрат вируса гриппа A(H1N1); КЦ1 – концентрат субъединиц вируса гриппа A(H1N1)

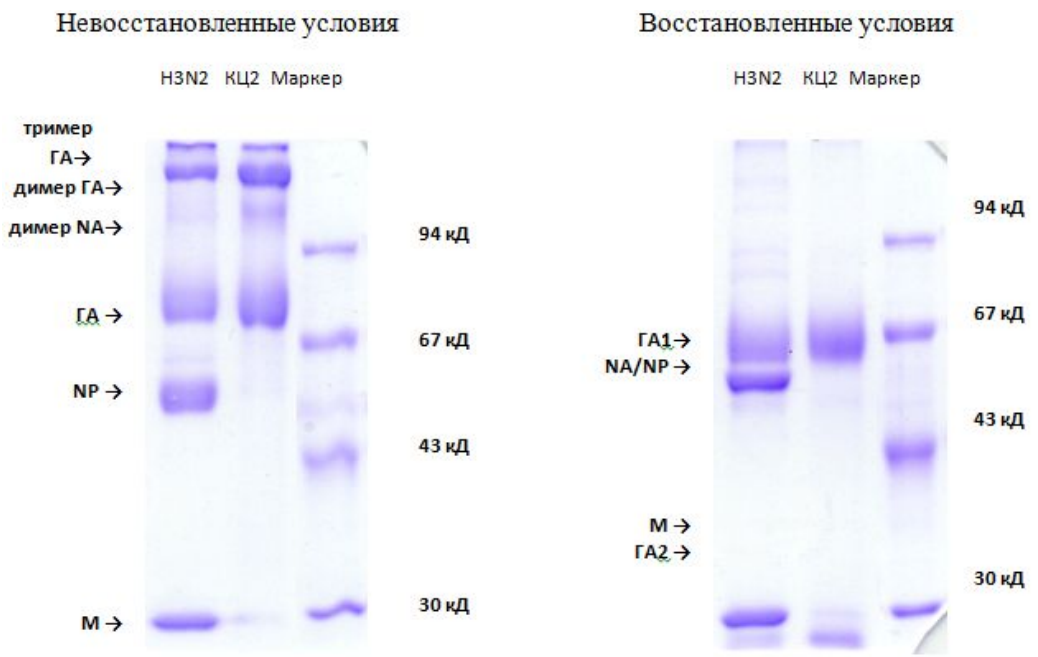


Рисунок 6 - Полипептидный состав концентрата субъединиц вируса гриппа подтипа A(H3N2), где H3N2 – концентрат вируса гриппа A(H3N2); КЦ2 – концентрат субъединиц вируса гриппа A(H3N2)

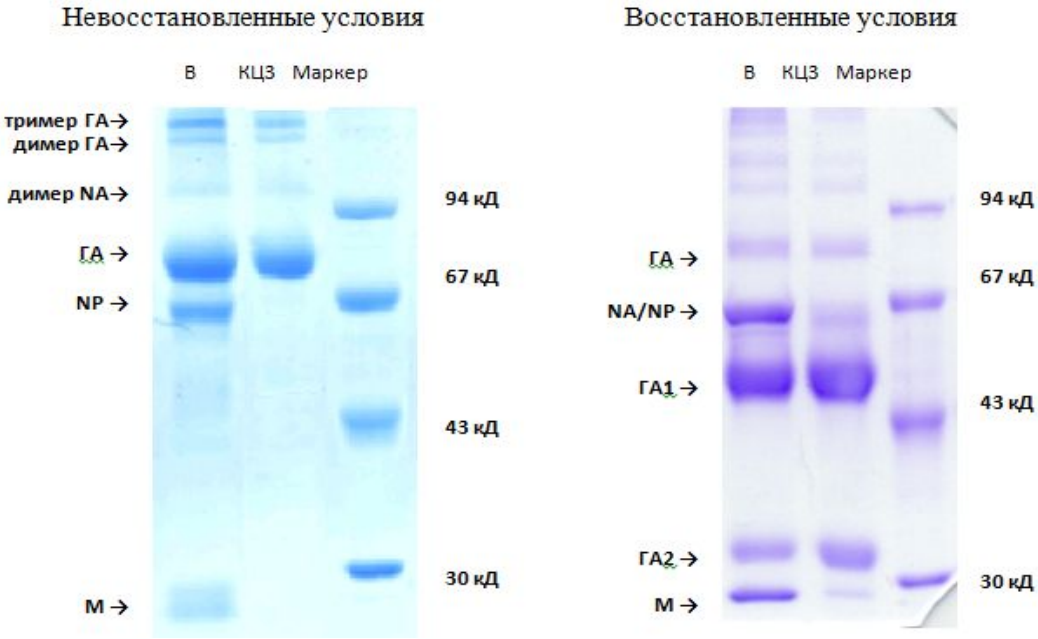


Рисунок 7 - Полипептидный состав концентрата субъединиц вируса гриппа типа B, где B – концентрат вируса гриппа B; КЦ3 – концентрат субъединиц вируса гриппа B

Как видно из рисунков молекулярная масса полипептидов вирусов гриппа в составе экспериментальных субъединичных вакцин (концентраты субъединиц

– КЦ1, КЦ2 и КЦ3): тримеров, димеров и мономеров гемагглютинина и нейраминидазы, а также М-белка не отличалась от молекулярной массы полипептидов, входящих в состав цельных вирионов вируса гриппа (A(H1N1); A(H3N2) и B). Анализ антигенного спектра концентратов субъединиц вируса гриппа свидетельствует об отсутствии в составе экспериментальных субъединичных вакцин нуклеопротеина (внутреннего белка) вируса гриппа и неспецифических белков субстрата (рисунки 5 - 7 Невосстановленные условия), а также существенное снижение содержания М-белка по сравнению с концентратами цельных вирионов вируса гриппа.

Полученные концентраты гриппозных вакцин содержали преимущественно субъединицы гемагглютинина и нейраминидазы: 95,5 % в концентрате вируса гриппа A(H1N1); 96,5 % - для подтипа A(H3N2); 98,6 % - для гриппа типа B. По данным денситометрии матриксный белок (М-белок) был представлен в следовых количествах: около 3,5 % в концентрате вируса гриппа A(H3N2); 1,4 % - гриппа B и около 4,5 % - гриппа A(H1N1).

Молекулярная масса полипептидов вируса гриппа в образцах разных подтипов вируса гриппа варьировала в следующих пределах: М-белок - 26 – 28 кДа; мономер НА – 75 -80 кДа; $ГА_1$ - 49 – 58 кДа; $ГА_2$ - 25 – 30 кДа; NA - 55 – 65 кДа; димер NA - 110 – 130 кДа; димер ГА - 150 – 160 кДа; тример ГА - 225 – 240 кДа, которые соответствуют данным литературы (Gregoriades, 1972; Haslam et al., 1970; Klenk et al., 1972; Lazarowitz et al., 1971; Lazarowitz et al., 1973; Lazdins et al., 1972; Skehel & Schild, 1971; Stanley et al., 1973).

Полученные данные позволяют утверждать, что исследуемые образцы содержали необходимые антигены для создания инактивированной субъединичной вакцины против сезонного гриппа в достаточно высокой концентрации. Посторонних белков и белков субстрата накопления вируса гриппа в исследуемых вакцинах отмечено не было, что свидетельствует о высокой степени очистки препарата от «балластных» включений.

3.2. Морфологические характеристики экспериментальной гриппозной вакцины при добавлении адъюванта Совидон

Способность адъюванта к взаимодействию с антигенами является ключевым фактором, обеспечивающим усиление иммунного ответа на компоненты вакцины. В связи с этим, представлялось интересным провести электронно-микроскопическое исследование экспериментальных вакцинных препаратов. Кроме экспериментальных вакцин с помощью электронной микроскопии были отдельно исследованы образцы вирионов вируса гриппа и их субъединиц.

Концентрат вирионов вируса гриппа типов А и В представляли собой очищенную и концентрированную взвесь. Вирионы имели шаровидную, удлиненную или неправильную форму с диаметром около 100 нм. Наблюдалось небольшое количество нитевидных частиц, что характерно для свежеприготовленного вирусного препарата. На поверхности вирионов выявлялись многочисленные интактные параллельно ориентированные молекулы гемагглютинина (рис. 8 а, б).

А Б

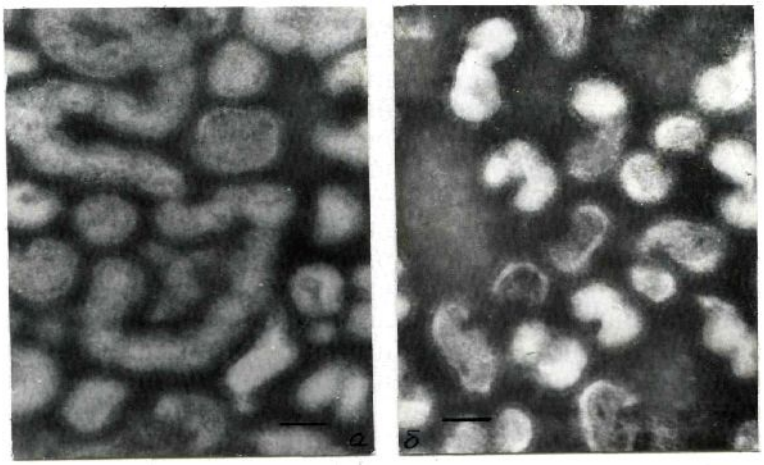


Рисунок 8 - Электронная микрофотография концентрата вирионов вируса гриппа А и В: А – нитевидные частицы вируса гриппа; Б – вирионы гриппа классической формы. Увеличение 100 000 х. Масштабная линейка соответствует 100 нм (предоставлено в.н.с. НИИВС им. Мечникова РАМН Лотте В.Д.)

В концентрате субъединиц были обнаружены как свободный гемагглютинин, так и розетки гемагглютинина (на рисунке указаны стрелками) (рис. 9). Выявлялось небольшое количество мембран вириона в виде одиночных линейных структур (на рисунке указана стрелкой со звездочкой). На поверхности мембран, в подавляющем большинстве случаев, присутствовали правильно ориентированные интактные молекулы гемагглютинина (рис. 9).

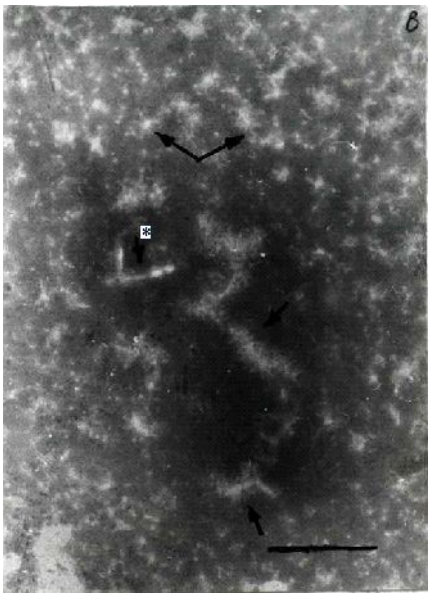


Рисунок 9 - Электронная микрофотография субъединичных структур вируса гриппа. Стрелками обозначены скопления гемагглютинина, стрелка со звездочкой указывает на фрагмент вирионной мембраны. Увеличение 200 000 х. Масштабная линейка соответствует 100 нм (предоставлено в.н.с. НИИВС им. Мечникова РАМН Лотте В.Д.)

В экспериментальной вакцине с Совидоном адъювант представлял собой каплевидные образования, состоявшие из аморфного материала с включенными в него электронно-плотными наночастицами (рисунок 10 А), которые имели размер 80 – 350 нм. Морфологически они были сходны со структурами, образуемыми полиэлектролитами.

Важно отметить факт взаимодействия антигенных структур вакцины с адъювантом. До добавления вирусных субъединиц препарат Совидон представлял собой бесструктурную электронно-плотную массу (рис. 10 Г), а в составе вакцины - комплекс наночастиц размером 80 - 350 нм (рис. 10 А). На рисунках 10 А, Б и В представлены наноцастицы, образованные адъювантом и

субъединичными компонентами вакцины. Видно, что они имеют заметное сходство с виросомами.

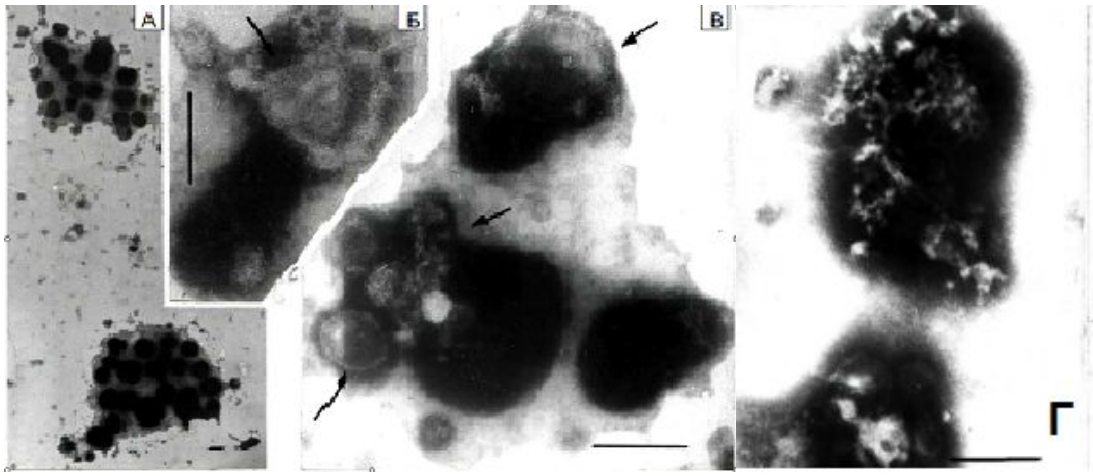


Рисунок 10 - Электронная микрофотография: взаимодействие вирусных субъединиц с препаратом Совидон в составе экспериментальной вакцины (А, Б, В); Препарат Совидон (Г). Увеличение А – 20 000 х; Б, В - 210 000 х; Г – 190 000 х. Масштабная линейка соответствует 100 нм (предоставлено в.н.с. НИИВС им. Мечникова РАМН Лотте В.Д.)

В гриппозной вакцине с гидроксидом алюминия не обнаружено взаимодействия адъюванта с субъединичными структурами вируса гриппа. В изученных образцах адъювант был представлен неструктурированным бесформенным электронно-плотным образованием (рис. 11).

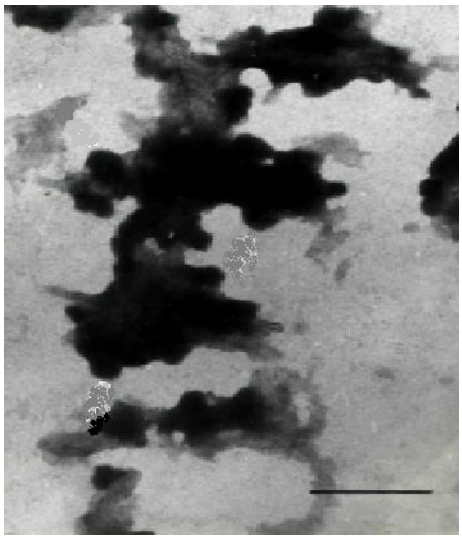


Рисунок 11 - Электронная микрофотография гидроксида алюминия: Увеличение 200 000 х. Масштабная линейка соответствует 100 нм (предоставлено в.н.с. НИИВС им. Мечникова РАМН Лотте В.Д.)

Полиоксидоний в составе экспериментальной вакцины взаимодействовал с вирусными субъединицами с образованием наночастиц размером 70-500 нм неправильной формы (рис. 12 А). В образцах также выявлялись конденсаты материала, морфологически идентичного материалу гранул. Указанные конденсаты, вероятно, представляют собой матрикс, из которого формировались гранулы адъюванта.

Биологический материал (рисунок 12 Б) имел структуру, типичную для субвирионных образований, и состоял из смеси фрагментов вирионных мембран и гемагглютинина.

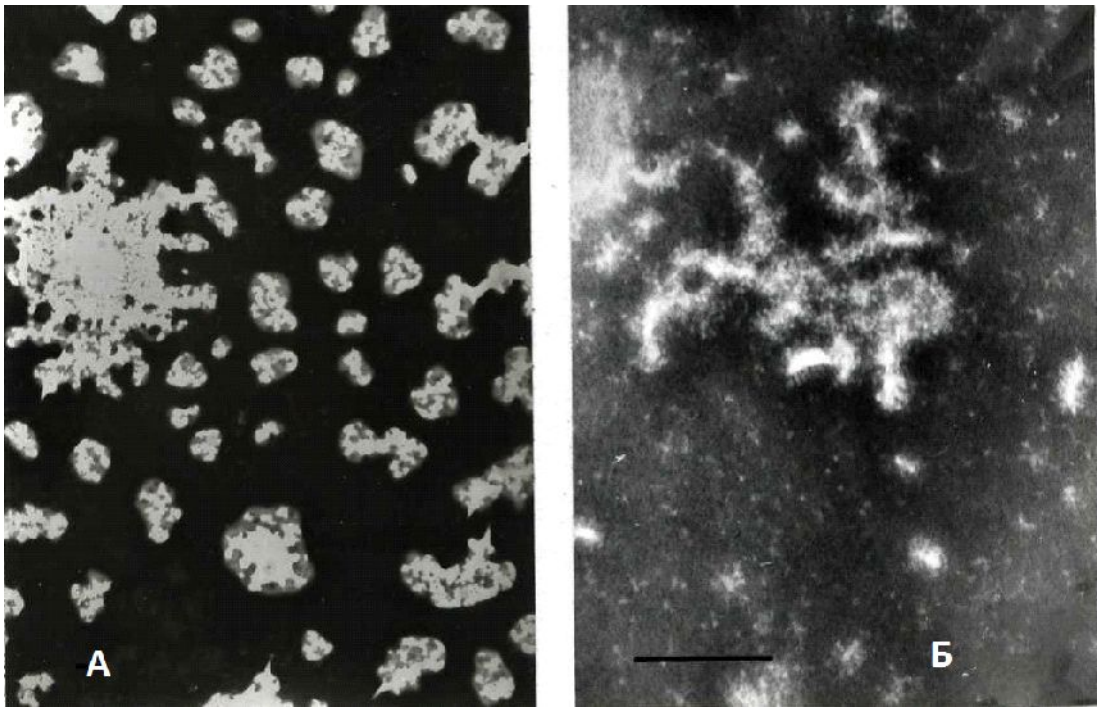


Рисунок 12 - Электронная микрофотография: взаимодействие вирусных субъединиц с препаратом Полиоксидоний в составе экспериментальной вакцины. Увеличение: А – 30 000 х; Б - 200 000 х. Масштабная линейка соответствует 100 нм (предоставлено в.н.с. НИИВС им. Мечникова РАМН Лотте В.Д.)

Таким образом, оба полиэлектролита формируют наночастицы с гемагглютинином вируса гриппа. Преимуществом Совидона по сравнению с Полиоксидонием является его способность к образованию наночастиц размером 80–350 нм, сходных с виросомами, в которых локализованы

поверхностные антигены вируса гриппа, что позволяет считать Совидон перспективным адъювантом для инактивированной гриппозной вакцины.

3.3. Выбор оптимальной дозы адъюванта

Апробировали две дозы адъюванта - 250 и 500 мкг. Исследования по безопасности и иммуногенности экспериментальных вакцин проводились на нелинейных белых мышах (m = 10 - 12 г) и беспородных хорьках (m = 1100 – 1500 г), серонегативных (титр специфических антител менее 1:10) по отношению к вакцинным штаммам вируса гриппа типов А и В. При этом основным критерием выбора дозы адъюванта являлась иммуногенность исследуемых вакцин, которую определяли по среднегеометрическим титрам (СГТ) антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) к штаммам вирусам гриппа, входящим в состав тривалентной вакцины.

Мышам вакцины вводили внутримышечно двукратно по 0,5 мл с интервалом 7 суток, хорькам - однократно внутримышечно по 0,5 мл. Мыши (n = 132) были распределены в 4 группы:

1 группа – вводили вакцину Совигрипп (Совидон 500 мкг) (n = 36);

2 группа – вводили вакцину Совигрипп (Совидон 250 мкг) (n = 36);

3 группа – вводили безадъювантную инактивированную гриппозную вакцину (n = 36);

4 группа – вводили однократно 0,5 мл физиологического раствора (n = 24).

Хорьки (n = 80) были распределены следующим образом:

1 группа – вводили вакцину Совигрипп (Совидон 500 мкг) (n = 20);

2 группа - вводили вакцину Совигрипп (Совидон 250 мкг) (n = 20);

3 группа - вводили препарат Совидон 500 мкг (n = 10);

4 группа - вводили препарат Совидон 250 мкг (n = 10);

5 группа - вводили вакцину Гриппол (n = 10);

6 группа - вводили физиологический раствор (n = 10).

3.3.1. Изучение безопасности экспериментальных инактивированных гриппозных вакцин и препарата Совидон

Наблюдение за мышами и хорьками на протяжени всего эксперимента не выявило никаких отклонений в поведении и соматическом статусе животных опытных групп по сравнению с группой плацебо.

Мышей взвешивали до введения препарата, на 7 и 14 сутки, статистически значимых отклонений от контрольной группы и в динамике обнаружено не было ($p > 0,05$) (данные не представлены). Хорьков взвешивали до начала исследования, на 14 и 21 сутки после введения препарата в одно и то же время, данные представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Влияние однократного внутримышечного введения гриппозных вакцин на массу тела хорьков

Препараты	Масса тела хорьков в группе (M ± m), кг		
	до вакцинации	на 14 сутки после вакцинации	на 21 сутки после вакцинации
Вакцина Совигрипп (Совидон 500 мкг)	1,35 ± 0,36	1,39 ± 0,34	1,41 ± 0,34
Вакцина Совигрипп (Совидон 250 мкг)	1,30 ± 0,12	1,30 ± 0,12	1,32 ± 0,13
Препарат Совидон (500 мкг)	1,30 ± 0,12	1,33 ± 0,13	1,34 ± 0,13
Препарат Совидон (250 мкг)	1,30 ± 0,21	1,34 ± 0,08	1,38 ± 0,10
Вакцина Гриппол	1,30 ± 0,06	1,28 ± 0,07	1,31 ± 0,06
Физиологический раствор	1,30 ± 0,13	1,30 ± 0,13	1,28 ± 0,46

Примечание: уровень значимости $p > 0,017$

При использовании парного критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для каждой группы отдельно, гипотеза H_0 о том, что средние значения массы тела животных до вакцинации, на 14 сутки и на 21 сутки после введения препаратов не различаются, не была отвергнута ($p > 0,017$).

Из этого следует, что введение исследуемых препаратов не приводило к статистически значимому изменению веса хорьков на протяжении 21 суток.

Соответственно, введение исследуемых препаратов хорькам не приводит ни к ожирению, ни к резкой потере веса, что свидетельствует об отсутствии токсического действия.

Для изучения возможной пирогенности как препарата Совидон, так и вакцин, в состав которых он входит как адъювант, ежедневно проводили мониторинг температуры тела хорьков с помощью термометров, проверенных в установленном порядке. Средние значения температуры до введения препаратов и после введения представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Влияние однократного внутримышечного введения гриппозных вакцин на температуру тела хорьков

	Температура тела хорьков в группе (M ± m), ^{0}C	
	до введения	после введения
Вакцина Совигрипп (Совидон 500 мкг)	38,6 ± 0,29	38,5 ± 0,27
Вакцина Совигрипп (Совидон 250 мкг)	38,7 ± 0,32	38,5 ± 0,27
Препарат Совидон (500 мкг)	38,7 ± 0,37	38,5 ± 0,27
Препарат Совидон (250 мкг)	38,6 ± 0,31	38,5 ± 0,25
Вакцина Гриппол	38,7 ± 0,30	38,5 ± 0,28
Физиологический раствор	38,7 ± 0,30	38,5 ± 0,28

Примечание: уровень значимости $p > 0,05$

При использовании парного критерия Стьюдента для каждой группы отдельно, гипотеза H_0 о том, что температура животных до введения препаратов и после введения не различаются, не была отвергнута. Из этого следует, что температура тела животных в опытных и контрольных группах в течение срока наблюдения оставалась в пределах видовой нормы, что позволяет нам говорить об отсутствии пирогенности вводимых препаратов.

Кроме того, в рамках изучения безопасности экспериментальной вакцины проводили исследование пирогенности на кроликах ($n = 6$; $m = 2$ - 2,5 кг). Ректальную температуру измеряли до введения 1 дозы инактивированных

гриппозных вакцин Совигрипп и Гриппол, далее три раза с промежутками в 1 час после введения. Результаты представлены в таблице 10.

Сумма повышения температуры у трех кроликов составила 0,8 ^{0}C для вакцины Совигрипп и 0,7 ^{0}C - для вакцины Гриппол. Считается, что препарат не пирогенен, если сумма максимальных повышений температур у трех кроликов $\sum\Delta t$ меньше или равна 1,2 ºС, а индивидуальное повышение температуры ни у одного из кроликов не превышает 0,5 ºС. Полученные данные, представленные в таблице 14, указывают на отсутствие пирогенности у исследуемых вакцин в соответствии с требованиями ГФ XII.

Таблица 10 - Температурная реакция кроликов на введение гриппозных вакцин

№№ кроликов	Температура после введения, °С				Максимальный, подъем температуры, ^{0}C
	До вакцинации	1 час	2 часа	3 часа	
Вакцина Совигрипп					
1	39,2	39,4	39,4	39,3	0,2
2	39,0	39,2	39,2	39,3	0,3
3	38,9	39,2	39,0	39,2	0,3
Вакцина Гриппол					
4	38,9	39,0	39,1	39,2	0,3
5	39,0	39,2	39,3	39,2	0,3
6	39,2	39,2	39,3	39,2	0,1

Таким образом, в исследованиях на хорьках и кроликах было показано отсутствие пирогенности как для препарата Совидон, так и для инактивированных гриппозных вакцин его содержащих.

Для исследования возможного негативного влияния однократного введения препаратов на органы и системы органов животных на 21 сутки после начала исследования была проведена некропсия хорьков, участвующих в эксперименте, с последующим макроскопическим и микроскопическим анализом.

Состояние внутренних полостей, органов и тканей животных опытных и контрольной групп не отличалось. Масса органов хорьков всех групп находилась в пределах видовой нормы.

В результате проведенных гистологических исследований установлено отсутствие специфических патологических изменений у лабораторных животных, получавших как вакцины, так и препарат Совидон в дозировках 250 и 500 мкг.

Слизистая кишечника была сохранена на всем протяжении. Наблюдавшийся умеренный отек подслизистого слоя был характерен для всех животных, как опытных, так и контрольной групп, и не был связан с введением препаратов (рис. 13). На снимке Е также показан фрагмент прилежащей к стенке кишки поджелудочной железы, структура ее сохранена, патологических особенностей не обнаружено.

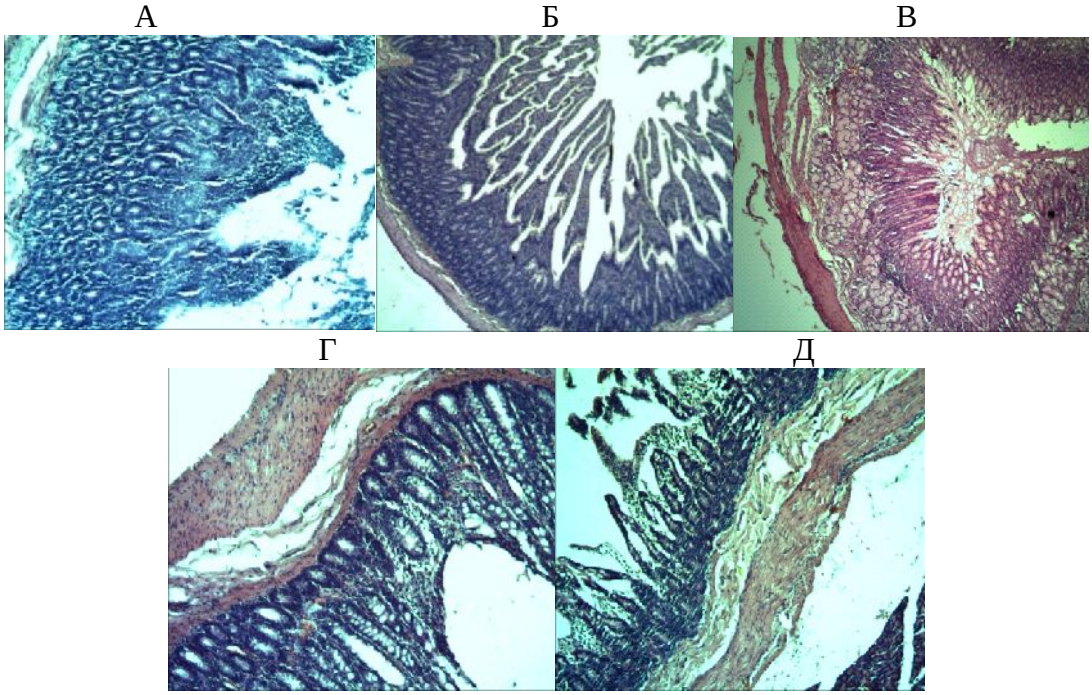


Рисунок 13 - Гистологические срезы слизистой кишечника хорьков (окраска гематоксилин-эозином) из группы получавших:

А - вакцину Совигрипп (Совидон 500 мкг). Увеличение х400;
Б - вакцину Совигрипп (Совидон 250 мкг). Увеличение х400;
В - препарат Совидон (500 мкг). Увеличение х400;
Г - вакцину Гриппол Увеличение х400;
Д - физиологический раствор. Увеличение х400.
(Препараты предоставлены сотрудниками филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны» - «ВЦ»)

У части животных опытных и контрольной групп наблюдали умеренный перицеллюлярный отек, полнокровие мягкой мозговой оболочки, у некоторых – с периваскулярными кровоизлияниями. Скорее всего, подобные изменения были вызваны передозировкой препарата Золетил-100, который использовали для эвтаназии животных в высокой дозе до полного угнетения основных функций центральной нервной системы (рис. 14).

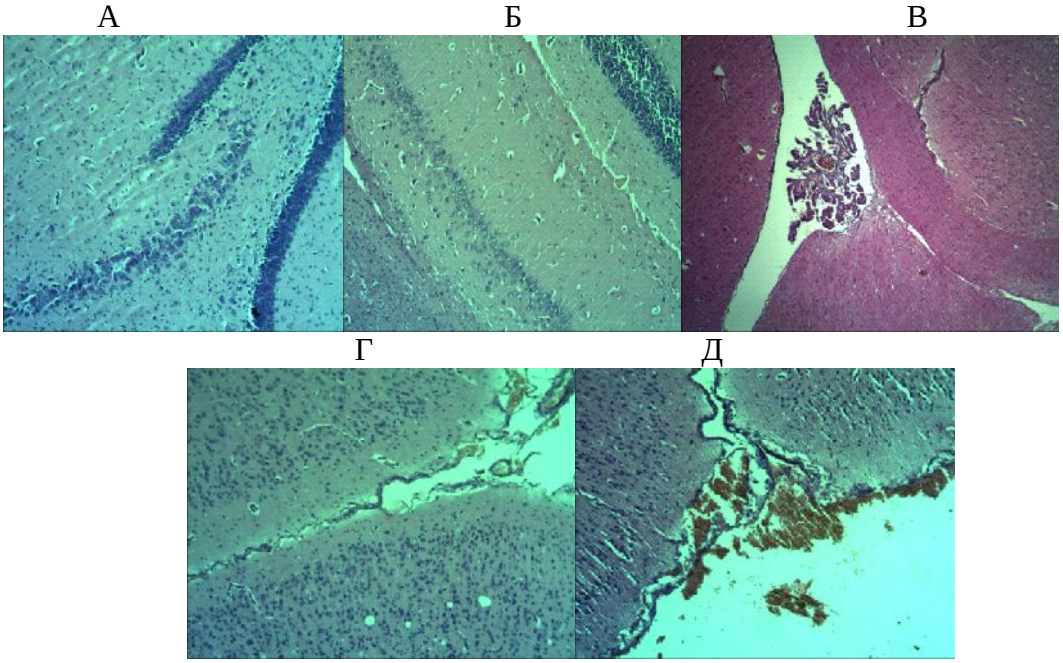


Рисунок 14 - Гистологические срезы головного мозга хорьков (окраска гематоксилин-эозином):

А – ядра зрительного бугра хорька получившего вакцину Совигрипп (Совидон 500 мкг). Увеличение х400;
Б - ядра зрительного бугра хорька получившего физиологический раствор. Увеличение х400;
В – просвет желудочка с хориальным сплетением хорька получившего препарат Совидон (500 мкг). Увеличение х400.;
Г - борозда, разделяющая извилины хорька получившего вакцину Гриппол. Увеличение х400;
Д – борозда, разделяющая извилины с периваскулярным кровоизлиянием у хорька контрольной группы. Увеличение х400.
(Препараты предоставлены сотрудниками филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны» - «ВЦ»)

Строение печени всех животных находилось в пределах видовых и возрастных особенностей: в некоторых случаях имелась вакуолярная или жировая дистрофия гепатоцитов. У части животных, как в опытных, так и в контрольных группах в большей или меньшей степени был выражен мускатный

рисунок печени. Данные изменения носили неспецифический характер, не связанный с введением препаратов (рис. 15).

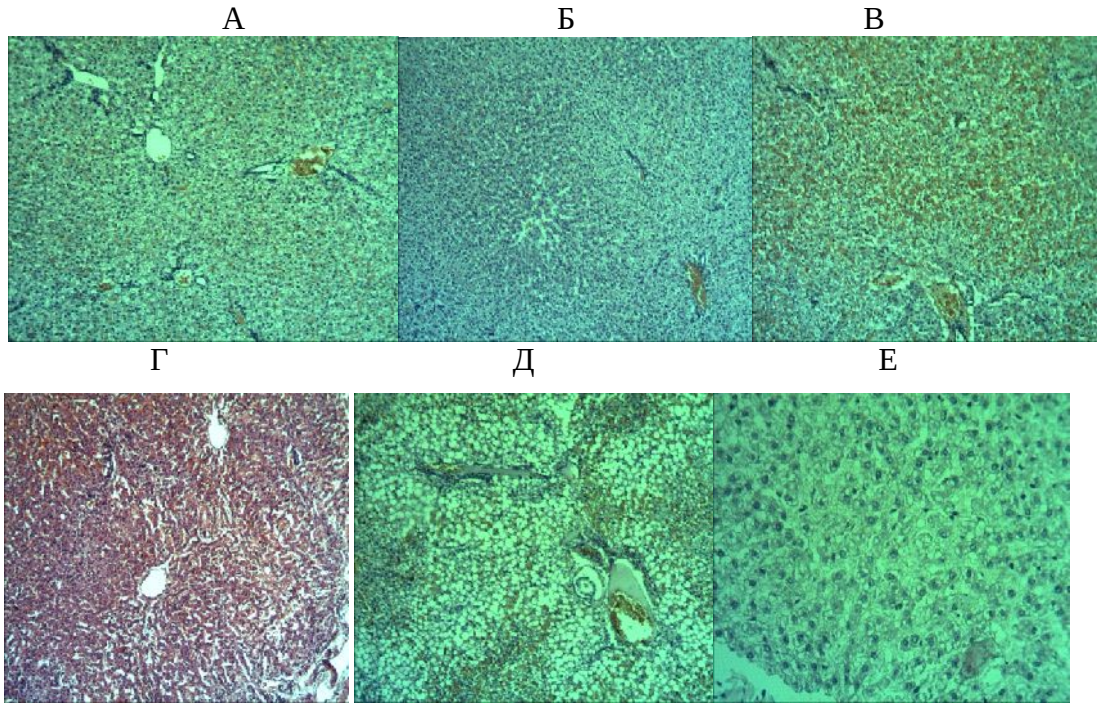


Рисунок 15 - Гистологические срезы печени хорьков (окраска гематоксилин-эозином) из группы получавших:

А – физиологический раствор. Увеличение х200.
Б - вакцину Совигрипп с консервантом (Совидон 500 мкг). Увеличение х200;
В – вакцину Совигрипп без консерванта (Совидон 500 мкг). Увеличение х200;
Г – препарат Совидон (500 мкг). Увеличение х200;
Д - вакцину Гриппол. Увеличение х200;
Е - физиологический раствор. Увеличение х200.
(Препараты предоставлены сотрудниками филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны» - «ВЦ»)

У всех исследованных групп животных миокард был нормального строения (рис. 16). На рисунке 17 показано место прокола миокарда при взятии крови: размозжение мышечных волокон с обширными перифокальными кровоизлияниями.

А Б

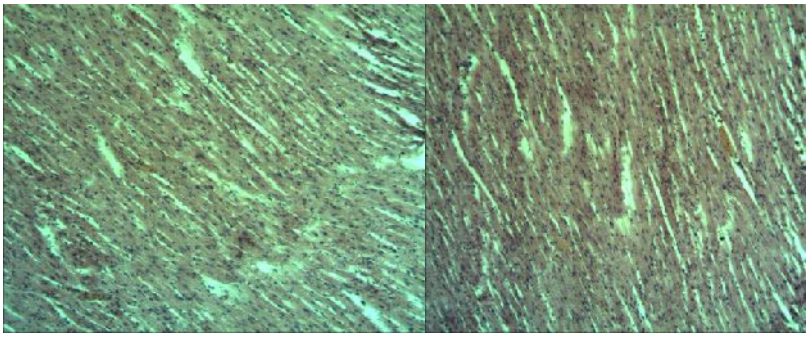


Рисунок 16 - Гистологические срезы (окраска пикрофуксином) миокарда хорьков из группы получавших:

А – физиологический раствор. Увеличение х100;
Б - вакцину Совигрипп (Совидон 500 мкг). Увеличение х100.
(Препараты предоставлены сотрудниками филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны» - «ВЦ»)

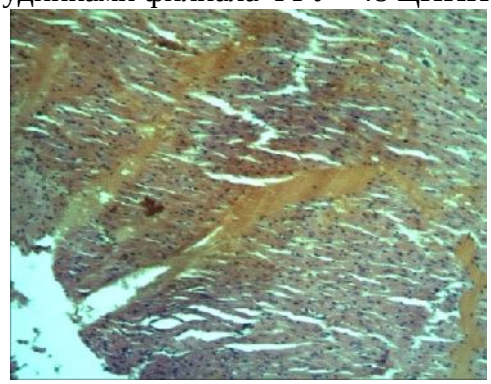


Рисунок 17 - Гистологический срез (окраска пикрофуксином) миокарда хорька из группы, получавшей вакцину Гриппол с участком прокола миокарда. Увеличение х100.
(Препараты предоставлены сотрудниками филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны» - «ВЦ»)

Также не было отмечено развития специфических патологий в строении бронхо-легочного аппарата животных (рис. 18).

Обнаруженная вариабельность в строении зародышевых центров в фолликулах селезенки хорьков не несла в себе патологических изменений и отражала лишь индивидуальные иммунологические особенности каждого животного. Было показано, что зародышевые центры в фолликулах селезенки были более выражены у животных, получавших исследуемые вакцины, чем в контрольной группе (рис. 19-24).

На рисунке 19 показано, что структура селезенки сохранена, фолликулы в большинстве случаев обычных размеров со светлыми центрами, занимающими от 1/3 до 1/2 объема фолликула.

А Б В

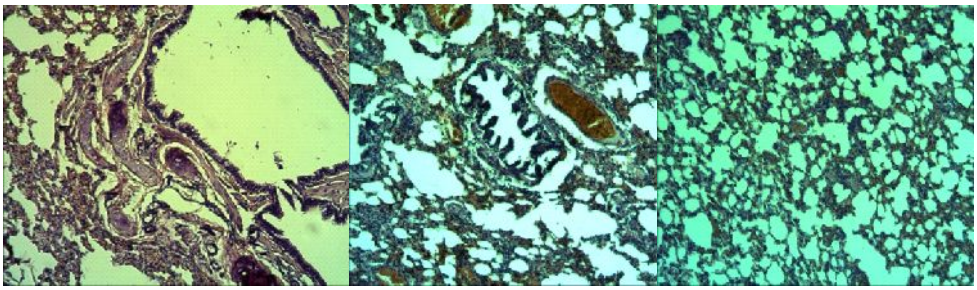
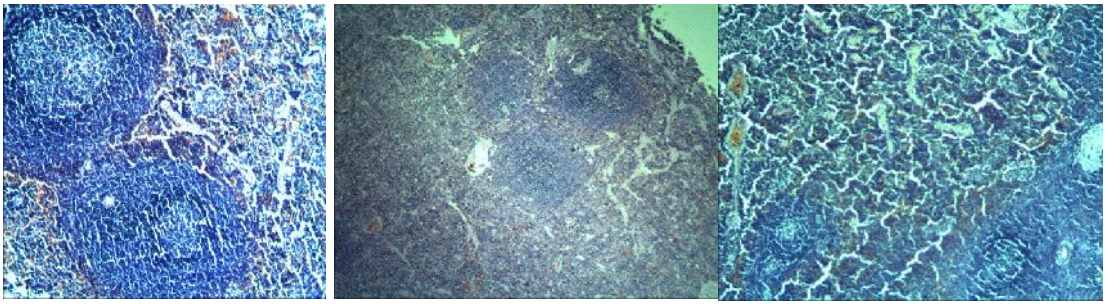


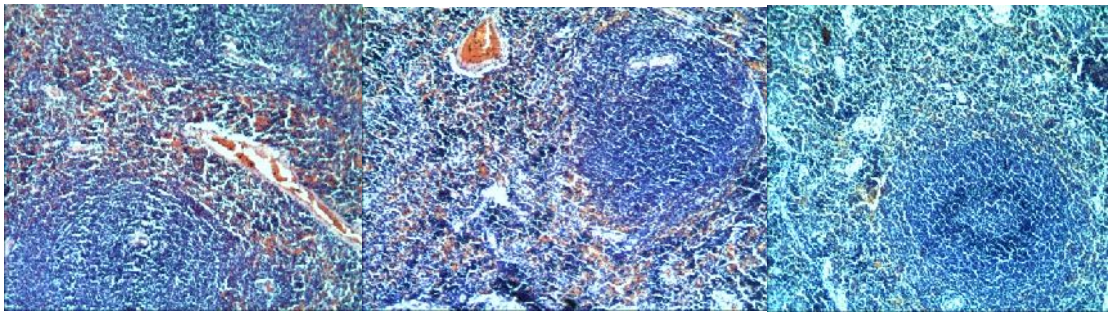
Рисунок 18 - Гистологический срез легкого (окраска гематоксилин-эозином):

А - Крупный бронх, мерцательный эпителий сохранен, перибронхиальное пространство без особенностей (вакцина Совигрипп (Совидон 500 мкг)). Увеличение х400;
Б - Спазмированый бронх, резкое полнокровие сосудов, очаговая эмфизема с разрывами отдельных альвеол и кровоизлияниями в межальвеолярные перегородки (вакцина Гриппол). Увеличение х400;
В - Нормальное строение легкого (физиологический раствор). Увеличение х200.
(Препараты предоставлены сотрудниками филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны» - «ВЦ»)

1-1 1-2 1-3



1-4 1-5 1-6



1-7 1-8 1-9

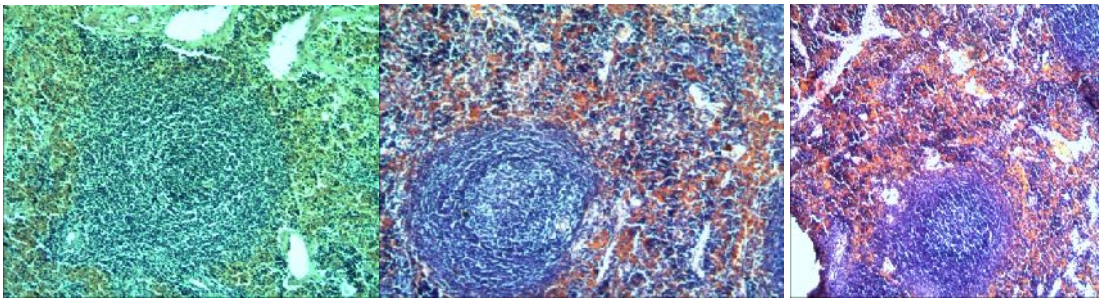


Рисунок 19 - Гистологический срез селезенки хорьков (1 - 9), получавших вакцину Совигрипп (Совидон 500 мкг) (группа № 1) (окраска гематоксилин-эозином). Увеличение х250. (Препараты предоставлены сотрудниками филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны» - «ВЦ»)

На рисунке 20 структура селезенки также сохранена, фолликулы обычных размеров со светлыми центрами, занимающими 1/3 объема фолликула, пульпа умеренно полнокровная.

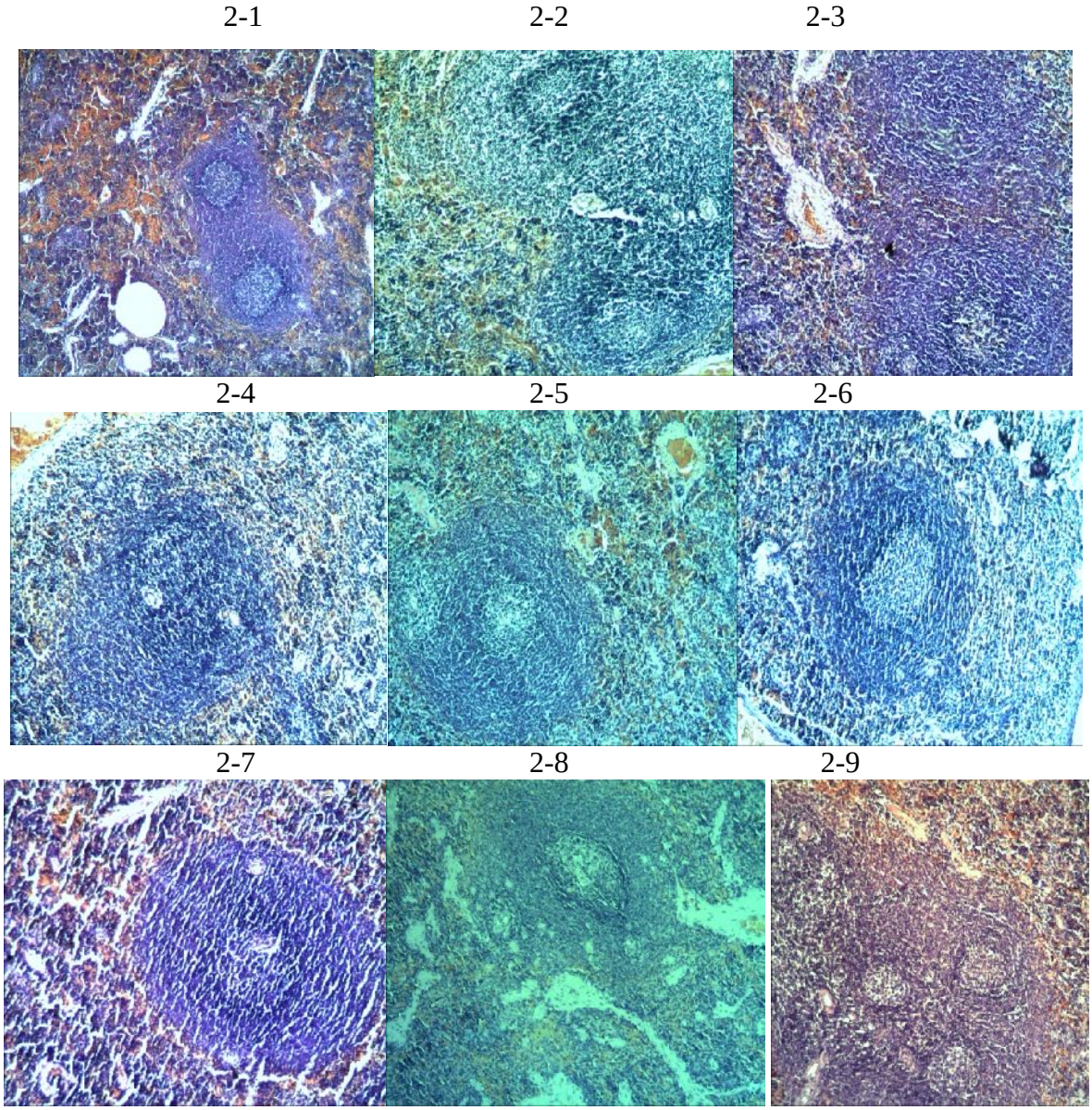


Рисунок 20 - Гистологический срез селезенки хорьков (1-9), получавших вакцину Совигрипп (Совидон 250 мкг) (группа № 2) (окраска гематоксилин-эозином). Увеличение х250. (Препараты предоставлены сотрудниками филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны» - «ВЦ»)

На рисунке 21 - структура селезенки сохранена, фолликулы обычных размеров со светлыми центрами, занимающими 1/3 объема фолликула, пульпа умеренно полнокровная, в случаях 3-1 и 3-7 зародышевые центры не выражены.

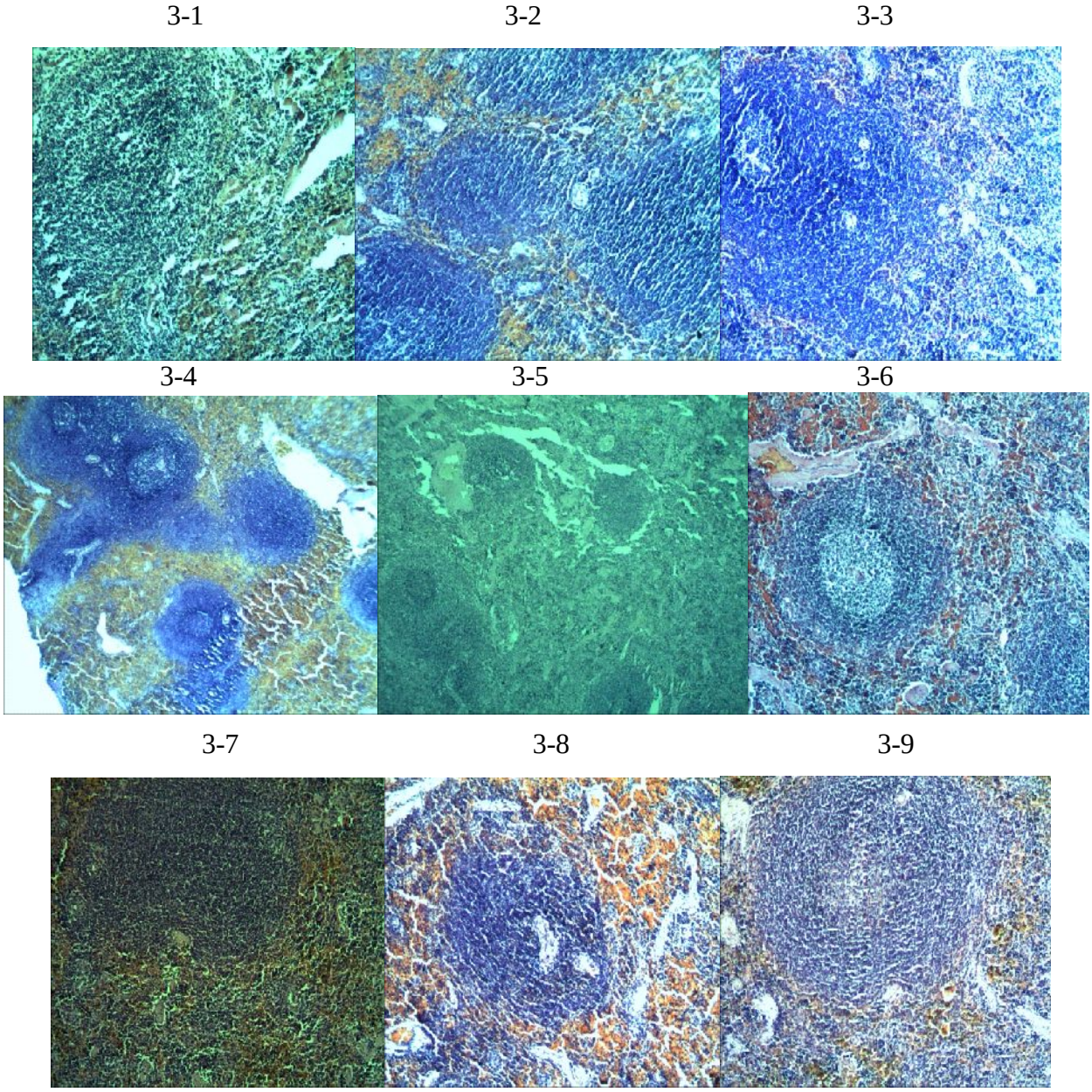


Рисунок 21 - Гистологический срез селезенки хорьков (1-9), получавших препарат Совидон (500 мкг) (группа № 3) (окраска гематоксилин-эозином). Увеличение х250. (Препараты предоставлены сотрудниками филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны» - «ВЦ»)

На рисунке 22 - структура селезенки сохранена, фолликулы обычных размеров со светлыми центрами, занимающими 1/8 часть объема фолликула, пульпа в части случаев умеренно полнокровная.

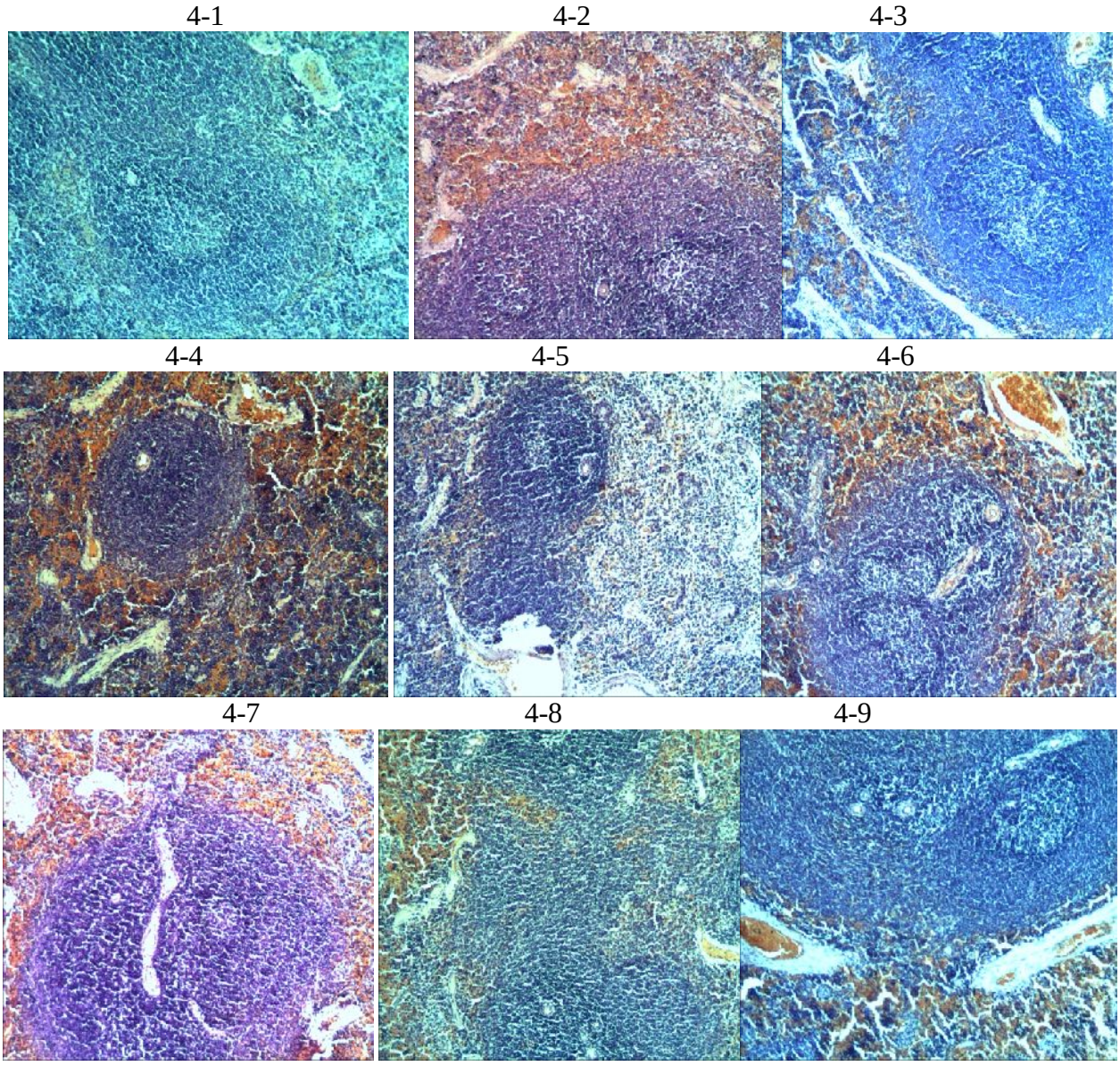


Рисунок 22 - Гистологический срез селезенки хорьков (1-9), получавших препарат Совидон (250 мкг) (группа № 4) (окраска гематоксилин-эозином). Увеличение х250. (Препараты предоставлены сотрудниками филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны» - «ВЦ»)

На рисунке 23 - структура селезенки сохранена, фолликулы обычных размеров со светлыми центрами, занимающими 1/3 объема фолликула, пульпа умеренно полнокровная.

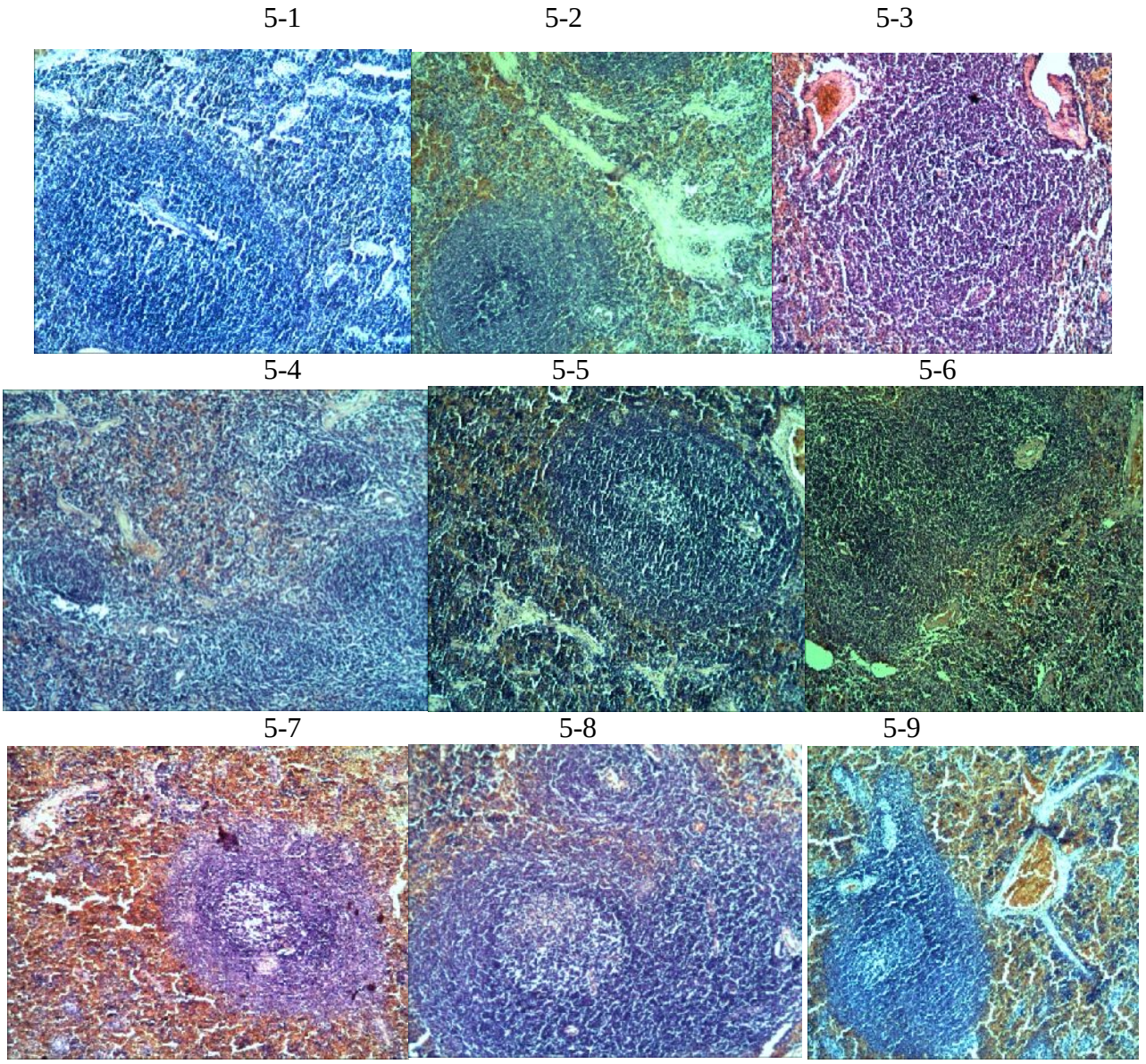


Рисунок 23 - Гистологический срез селезенки хорьков (1-9), получавших вакцину Гриппол (группа № 5) (окраска гематоксилин-эозином). Увеличение х250. (Препараты предоставлены сотрудниками филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны» - «ВЦ»)

В группе, получавшей плацебо (рис. 24) у исследованных животных были наименее выражены зародышевые центры фолликулов по сравнению с группами, получавшими вакцины, в целом структура органа полностью сохранена.

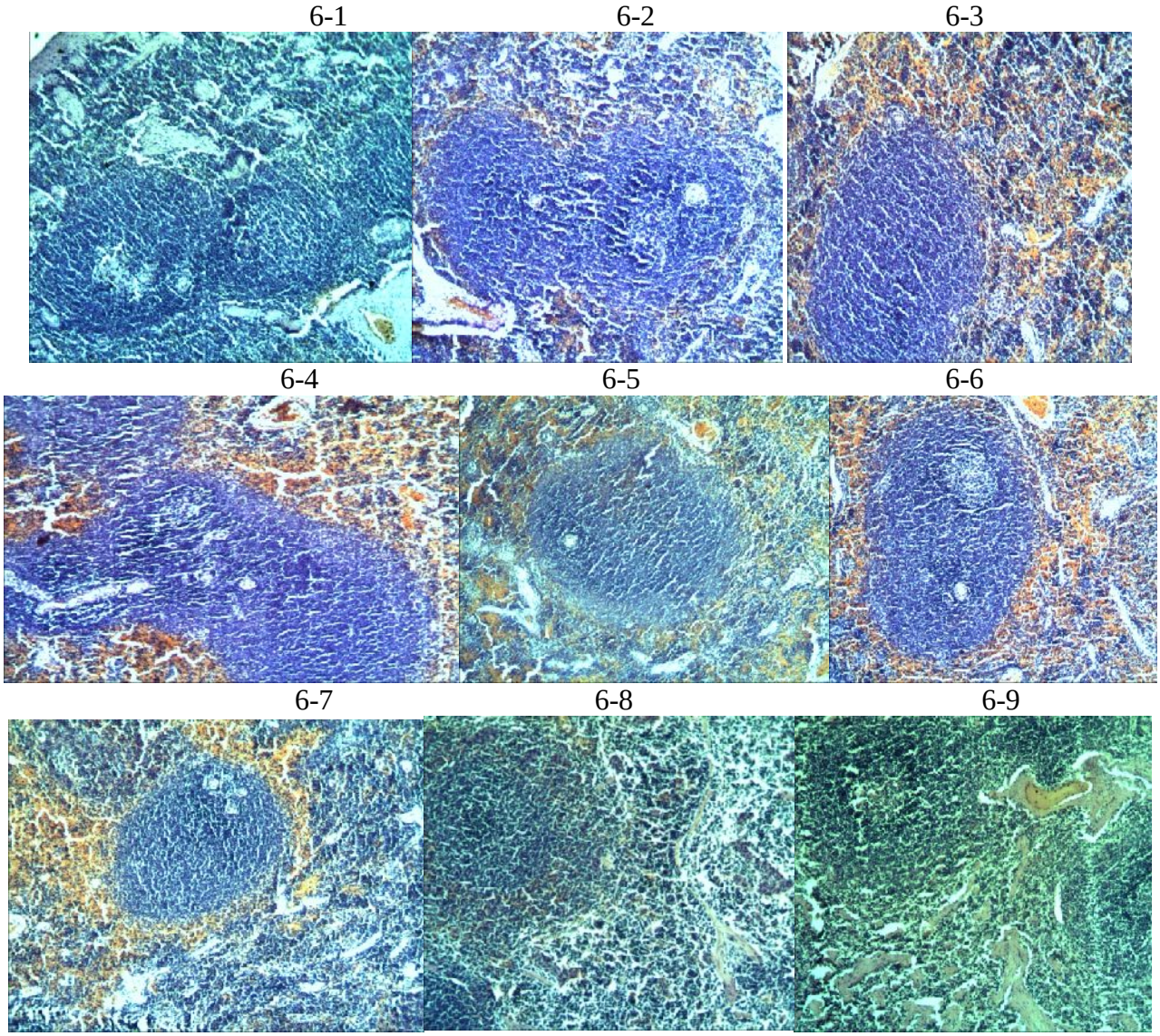


Рисунок 24 - Гистологический срез селезенки хорьков (1-9), получавших физиологический раствор (группа № 6) (окраска гематоксилин-эозином). Увеличение х250. (Препараты предоставлены сотрудниками филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны» - «ВЦ»)

Таким образом, было показано, что однократное внутримышечное введение адъюванта Совидон в обеих дозировках и гриппозных вакцин с совидоном не токсично для хорьков.

Также, исходя из наличия и объема зародышевых центров фолликулов селезенки, можно сделать предположение о том, что исследуемые вакцины способны стимулировать антителогенез (Kulkarni et al., 2014).

3.3.2. Сравнительное изучение иммуногенности вакцины Совигрипп с содержанием различных дозировок препарата Совидон

На первом этапе была проведена сравнительная оценка антигенной активности двух адъювантных вакцин с различным содержанием Совидона и аналогичной вакцины без адъюванта при двукратной внутримышечной иммунизации мышей. Показано увеличение СГТ сывороточных антител в группе вакцины с адъювантом в дозе 250 мкг в 2,8; 2,5 и 1,4 раз, а в группе вакцины с адъювантом в дозе 500 мкг - в 4,5; 2,5 и 1,6 раз в отношении вирусов гриппа A(H1N1); A(H3N2) и B соответственно (табл. 11).

Таблица 11 - Показатели антигенной активности экспериментальных гриппозных вакцин при двукратном внутримышечном введении мышам

Препарат	Среднегеометрические титры сывороточных антител в РТГА, обратные величины		
	A (H_1N_1)	A (H_3N_2)	B
Совигрипп (Совидон 500 мкг) (n = 36)	507,96	570,18	89,80
Совигрипп (Совидон 250 мкг) (n = 36)	320,00	570,17	80,00
ИГВ без адъюванта (n = 36)	113,4*	226,27	56,57
Физиологический раствор (n = 24)	14,14	14,14	12,60

*Примечание: $p < 0,05$ по отношению к экспериментальным группам мышей, иммунизированных вакциной Совигрипп

При использовании критерия Краскела-Уоллиса гипотеза H_0 о том, что среднее геометрическое титра антител в сыворотках животных привитых вакцинами не отличались от контроля, была отвергнута ($p<0,05$) в отношении всех штаммов. Таким образом, было показано, что иммунизация животных гриппозными вакцинами способствует нарастанию титра антител.

Изучение иммунологической эффективности вакцин на хорьках проводилось путем сопоставления титров специфических антител в сыворотках крови привитых животных до вакцинации, на 14 и 21 сутки после иммунизации. На момент вакцинации у всех хорьков титр специфических антител к вирусам гриппа типа А и В в РТГА был ниже 1:10, что говорило об их серонегативности к вакцинным штаммам вируса гриппа. Полученные результаты по иммуногенности представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Показатели иммуногенности вакцин при однократном внутримышечном введении хорькам

Вакцина	Вирус гриппа	Среднегеометрические титры сывороточных антител в РТГА, обратные величины		
		до введения	на 14 сутки	на 21 сутки
Вакцина Совигрипп (Совидон 250 мкг) (n = 20)	В	1:5	1:9	1:13*
	A(H3N2)	1:5	1:25*	1:83*@
	A(H1N1)	1:5	1:11	1:19*@
Вакцина Совигрипп (Совидон 500 мкг) (n = 20)	В	1:5	1:11	1:21*
	A(H3N2)	1:5	1:48*	1:320*#
	A(H1N1)	1:5	1:14*	1:42*
Вакцина Гриппол (n = 10)	В	1:5	1:12	1:22*
	A(H3N2)	1:5	1:26*	1:134*
	A(H1N1)	1:5	1:12	1:22*
Физиологический раствор (n = 10)	В	1:5	1:5	1:5
	A(H3N2)	1:5	1:5	1:5
	A(H1N1)	1:5	1:5	1:5

Примечание: * - статистически значимое отличие от группы контроля, уровень значимости $p < 0,05$; # - статистически значимое отличие от группы препарата сравнения, уровень значимости $p < 0,05$; @ - статистически значимое отличие между группами Вакцина

Совигрипп (Совидон 250 мкг) и Вакцина Совигрипп (Совидон 500 мкг), уровень значимости $p < 0,05$

При использовании критерия Краскела-Уоллиса гипотеза H_0 о том, что среднее геометрическое титра специфических антител на 21 сутки после введения вакцины Совигрипп или Гриппол не отличались от контроля, была отвергнута ($p<0,05$) в отношении всех штаммов. Таким образом, было показано нарастание титра специфических антител после вакцинации. Кроме того, уже на 14 сутки наблюдались статистически значимые ($p<0,05$) нарастания тиров в отношении некоторых штаммов, по сравнению с контролем (см. табл. 8).

Иммуногенность вакцины Совигрипп (Совидон 500 мкг) была значительно выше, чем у вакцины Совигрипп (Совидон 250 мкг) в отношении штаммов вируса гриппа типа А ($p<0,05$; критерий Манна-Уитни)

Гипотеза H_0 о том, что среднее геометрическое титра специфических антител на 21 сутки после введения вакцины Совигрипп (Совидон 500 мкг) и Гриппол не отличались, при использовании критерия Манна-Уитни, была отвергнута ($p<0,05$) в отношении штамма вируса гриппа подтипа A(H3N2).

Таким образом, на 21 сутки иммуногенность вакцины Совигрипп (Совидон 500 мкг) была достоверно выше, чем вакцины Совигрипп (Совидон 250 мкг) и вакцины Гриппол в отношении штамма вируса гриппа типа A(H3N2) ($p < 0,05$; критерий Манна-Уитни).

Кроме того, представлялось интересным оценить процентное соотношение животных с защитным уровнем сывороточных антител (АТ) 1:40 и выше на 21 сутки после введения вакцин. В ходе анализа было показано, что на 21 сутки после однократного внутримышечного введения вакцины Гриппол защитный титр антител к вирусу гриппа типа A(H1N1) был достигнут у 30% хорьков, к вирусу гриппа A(H3N2) - у 70%, к вирусу гриппа В - у 50% животных. Для вакцины Совигрипп с содержанием адъюванта 250 мкг – 25%, 85% и 10%, соответственно, а для вакцины Совигрипп с содержанием адъюванта 500 мкг – 50%, 95% и 30%, соответственно (рис. 25).

Таким образом, по данным изучения иммуногенной активности и безопасности экспериментальных вакцин для дальнейших исследований была выбрана вакцина с дозой адъюванта Совидон, равной 500 мкг.

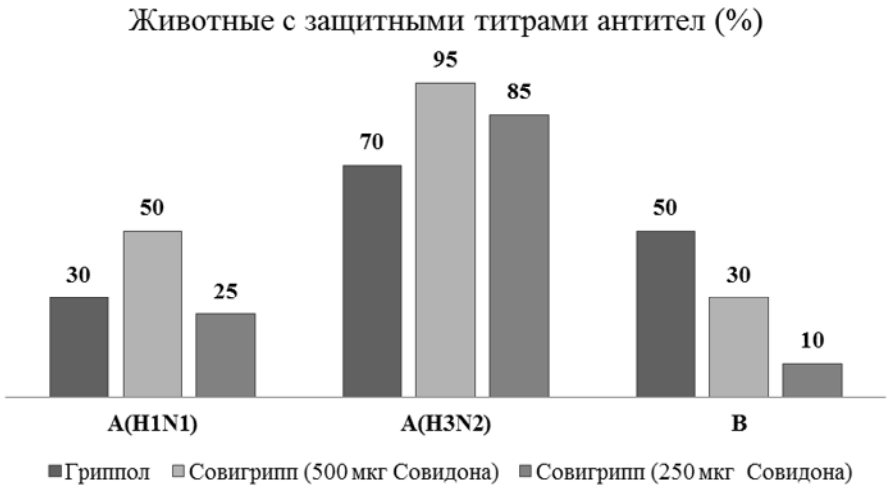


Рисунок 25 - Процентное соотношение животных с защитным уровнем АТ 1:40 и выше по отношению к штаммам вируса гриппа А (H1N1), А(H3N2) и В на 21 сутки после введения вакцин

В ходе дальнейших доклинических исследований на лабораторных животных (нелинейные белые мыши и крысы, мыши линии BALB/c, морские свинки, кролики породы Шиншилла, неполовозрелые нелинейные белые крысы), было показано отсутствие острой и хронической токсичности вакцины Совигрипп, местно-раздражающего, иммунотоксического и аллергизирующего действия, а также пирогенности, репродуктивной и эмбриональной токсичности (данные не приводятся). Полученные результаты позволили перейти к следующему этапу – клиническому исследованию инактивированной гриппозной вакцины Совигрипп (Совидон 500 мкг) на добровольцах в возрасте от 18 до 60 лет.

3.4. Клинические исследования гриппозной инактивированной вакцины Совигрипп

3.4.1. Переносимость, реактогенность и безопасность вакцины Совигрипп

Любая вакцина, вводимая человеку, обладает определенной степенью реактогенности, выражающейся в виде поствакцинальных реакций (нежелательных явлений). Как правило, такие состояния отражают развитие специфического иммунитета. Они кратковременны, проходят самостоятельно и не требуют врачебного вмешательства. Наряду с развитием адаптивного иммунитета при вакцинации происходят изменения неспецифического характера, которые касаются морфологии и белкового состава крови, ферментативной активности, свертывающей системы крови, функции надпочечников и других эндокринных органов. Эти изменения, как правило, также не имеют патологического характера, и продолжаются от нескольких дней до 1 − 2 нед., в редких случаях до 2 месяцев (Медуницын и Покровский, 2005).

Переносимость, реактогенность и безопасность инактивированной гриппозной вакцины Совигрипп изучалась при участии 330 добровольцев возрастом от 18 до 60 лет (средний возраст 31,4 ± 11,6 лет), данные по двум из них (1 – иммунизированный вакциной Совигрипп без консерванта и 1 – вакциной Гриппол) не были приняты к статистической обработке, вследствие появления интеркуррентной инфекции. Добровольцам однократно внутримышечно вводили одну дозу (0,5 мл) вакцины Совигрипп (с консервантом или без консерванта) или вакцины Гриппол или эквивалентный объем плацебо (физиологический раствор).

Суммарные данные по количеству добровольцев (%), у которых были отмечены местные и системные реакции в течение 7 дней после вакцинации, представлены на рисунке 26. В группе плацебо нежелательных явлений отмечено не было.

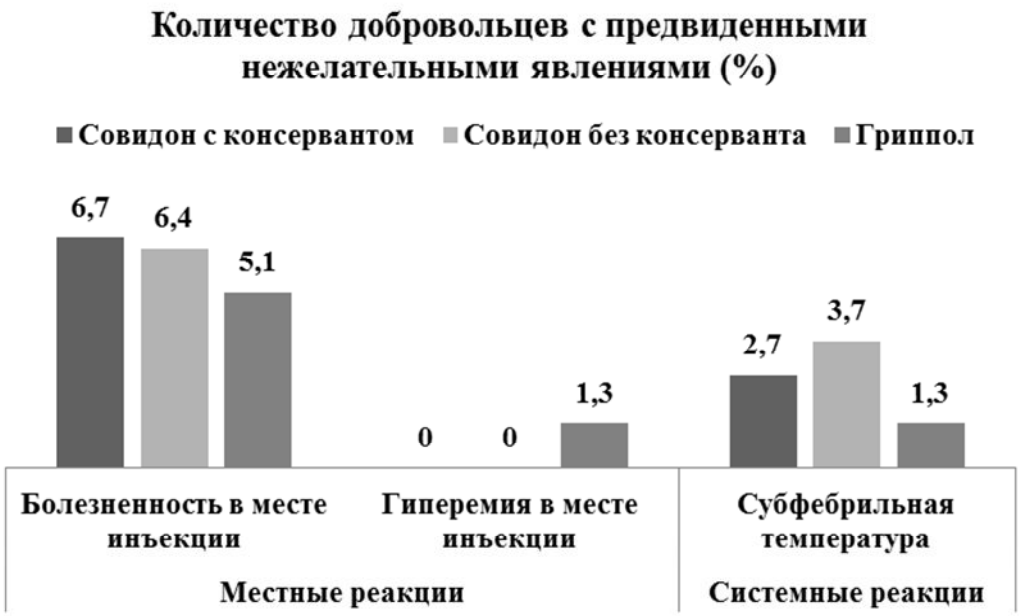


Рисунок 26 - Количество добровольцев (%), у которых были зарегистрированы предвиденные местные и системные нежелательные явления в течение 7 дней после вакцинации

При использовании критерия Краскела-Уоллиса, гипотезы H_0 об отсутствии различий в частоте местных и системных реакций между группами добровольцев, получавших вакцины Совигрипп, Совигрипп (б/к), Гриппол или плацебо не были отвергнуты ($p > 0,01$). Из этого следует, что частота местных и системных реакции у добровольцев, получавших плацебо и добровольцев, получавших гриппозные вакцины, не имела статистически значимого различия, что говорит о хорошей переносимости и низкой реактогенности исследуемых вакцин.

Отмечалось преобладание местных реакций в структуре всех выявленных нежелательных явлений после введения вакцины Совигрипп (67 %), которые в 100 % случаев были представлены появлением кратковременного дискомфорта (болезненности) в месте введения. Аналогичная картина наблюдалась и при введении вакцины Гриппол – 83,3 % местные реакции, из них в 80,0 % - появление кратковременного дискомфорта (болезненности) в месте введения, 20,0 % - гиперемия.

В ходе клинического исследования не были выявлены местные и системные реакции сильной степени выраженности, хотя была отмечена одна местная реакция (болезненность в месте введения) средней степени - при иммунизации вакциной Совигрипп (б/к). Данная реакция носила транзиторный характер и не регистрировалась уже на второй день, терапия не назначалась. Все реакции, как местные, так и системные, в том числе и средней степени выраженности, не требовали лечения и имели транзиторный характер.

Средние показатели биохимического и общего анализа крови представлены в таблицах 13 и 14. При использовании дисперсионного анализа для повторных наблюдений гипотеза H_0 о сходстве средних биохимических и гематологических показателей крови добровольцев до введения препарата, на 7-й и 21-й день после введения не была отвергнута ($p > 0,05$) для всех групп.

Таким образом, на протяжении всего исследования у добровольцев во всех группах биохимические и гематологические показатели крови претерпевали незначительные изменения, оставаясь в пределах нормальных значений.

Результаты общего анализа мочи добровольцев и данные неврологического осмотра не обнаружили патологических изменений (данные не представлены).

Ни в одной из групп добровольцев при анализе уровня общего IgE в сыворотке крови не было обнаружено существенных изменений в динамике (до вакцинации, на 7-й и на 21-й день после вакцинации) (табл. 15). Лица с изначально высоким уровнем IgE были зарегистрированы во всех группах добровольцев. В большинстве случаев высокий уровень IgE объяснялся наличием в анамнезе аллергической предрасположенности пищевого генеза (на цитрусовые) или поллиноза.

Таблица 13 - Влияние вакцин Совигрипп и Гриппол на биохимические показатели крови у добровольцев 18-60 лет

Показатели крови	до введения препаратов				на 7 сутки после вакцинации				на 21 сутки после вакцинации			
	Сови-грипп n=110	Сови-грипп (б/к) n=109	Грип-пол n=79	Пла-цебо n=30	Сови-грипп n=110	Сови-грипп (б/к) n=109	Грип-пол n=79	Пла-цебо n=30	Сови-грипп n=110	Сови-грипп (б/к) n=109	Грип-пол n=79	Пла-цебо n=30
АЛТ	23,1± 1,5	24,5± 2,0	22,1 ±1,0	26,4 ±2,0	22,2 ±1,3	23,8 ±1,4	23,6 ±1,0	25,4 ±2,0	24,9 ±1,9	25,5 ±1,7	23,4 ±1,4	30,1± 2,3
АСТ	24,2± 1,3	24,6± 1,4	21,3 ±0,9	26,8 ±1,6	24,7 ±1,3	24,3 ±1,0	22,9 ±1,0	27,4 ±1,7	25,9 ±1,3	25,4 ±1,7	25,9 ±1,9	31,2± 2,2
Билирубин общий	11,6± 0,8	11,7± 0,9	12,7 ±0,6	11,7 ±1,4	11,7 ±0,9	14,0 ±1,8	13,2 ±0,5	12,0 ±1,8	13,0 ±0,8	12,7 ±1,0	14,9 ±1,3	14,7± 1,5
Креатинин	77,9± 1,6	77,6± 1,4	80,3 ±1,2	78,1 ±3,0	79,5 ±1,6	77,8 ±1,3	79,3 ±1,1	81,3 ±3,2	80,4± 1,8	79,0 ±1,6	78,2 ±1,1	83,0± 3,4
Щелочная фосфатаза	95,9± 6,9	99,6± 7,3	95,5 ±4,5	105,9 ±8,2	99,7 ±6,9	96,6 ±7,0	101,8 ±5,1	103,6 ±8,6	97,7 ±5,9	103,0 ±7,3	92,9 ±4,3	110,3 ±9,0
Мочевина	4,7± 0,2	4,7± 0,3	4,3 ±0,1	4,6 ±0,8	4,8 ±0,2	4,5 ±0,2	4,6 ±0,1	5,1 ±0,8	4,6 ±0,2	4,8 ±0,2	4,5 ±0,1	5,3 ±0,8
Общий белок	72,8± 0,7	71,6± 0,8	73,7 ±0,5	72,3 ±2,7	72,8 ±1,5	72,0 ±0,7	73,7 ±0,5	71,8 ±2,6	72,9 ±0,9	72,7 ±0,7	73,7 ±0,5	71,2 ±2,6
СРБ	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.
Глюкоза	5,2± 0,2	5,1± 0,2	5,0 ±0,1	5,3 ±0,8	5,0 ±0,1	5,0 ±0,2	5,0 ±0,1	5,2 ±0,8	5,1 ±0,2	5,1 ±0,2	5,0 ±0,1	5,0 ±0,8

Примечание: уровень значимости $p > 0,05$

Таблица 14 - Влияние вакцин Совигрипп и Гриппол на гематологические показатели крови у добровольцев 18-60 лет

Показатели крови	до введения препаратов				на 7 сутки после вакцинации				на 21 сутки после вакцинации			
	Сови-грипп n=110	Сови-грипп (б/к) n=109	Грип пол n=79	Пла-цебо n=30	Сови-грипп n=110	Сови-грипп (б/к) n=109	Грип-пол n=79	Пла-цебо n=30	Сови-грипп n=110	Сови-грипп (б/к) n=109	Грип-пол n=79	Пла-цебо n=30
Гемоглобин	139,9 ±2,2	138,5 ±2,3	141,6 ±1,6	143,7 ±5,9	138,1 ±2,3	138,6 ±2,2	141,1 ±1,7	141,0 ±5,8	137,5 ±2,1	139,3 ±2,3	140,2 ±1,5	143,1 ±6,0
Эритроциты	4,6 ±0,2	4,8 ±0,4	4,7 ±0,1	4,3 ±0,9	4,7 ±0,1	4,6 ±0,2	4,7 ±0,1	4,7 ±0,8	4,7 ±0,1	4,7 ±0,1	4,6 ±0,1	4,8 ±0,8
Лейкоциты	6,5 ±0,3	6,3 ±0,3	6,6 ±0,2	6,0 ±0,9	6,9 ±0,3	6,5 ±0,3	6,8 ±0,3	5,9 ±0,8	6,5 ±0,3	7,2 ±0,8	6,6 ±0,2	6,5 ±0,8
Палочко-ядерные	1,9 ±0,2	2,0 ±0,2	1,5 ±0,1	2,1 ±0,9	1,8 ±0,2	1,7 ±0,2	1,5 ±0,1	1,9 ±0,9	1,7 ±0,2	1,7 ±0,2	1,5 ±0,1	1,7 ±0,9
Сегменто-ядерные	57,3 ±1,2	56,8 ±1,2	59,1 ±0,9	56,5 ±2,3	57,1 ±1,3	58,0 ±1,2	59,1 ±0,9	55,3 ±2,1	57,5 ±1,2	56,2 ±1,3	56,6 ±1,3	59,1 ±2,3
Эозинофилы	1,9 ±0,3	2,6 ±0,3	2,4 ±0,2	2,1 ±0,9	2,6 ±0,3	2,8 ±0,3	2,4 ±0,2	2,3 ±0,9	2,7 ±0,3	2,6 ±0,3	2,0 ±0,2	2,5 ±0,9
Лимфоциты	32,6 ±1,1	31,9 ±1,1	30,5 ±0,8	33,4 ±1,7	31,8 ±1,3	30,9 ±1,1	30,8 ±0,8	34,2 ±1,4	31,0 ±0,9	33,4 ±1,1	33,4 ±1,0	30,8 ±1,5
Моноциты	6,4 ±0,4	6,6 ±0,5	6,3 ±0,3	5,9 ±0,9	6,7 ±0,5	6,6 ±0,4	6,0 ±0,3	6,2 ±0,9	6,7 ±0,4	6,4 ±0,4	6,4 ±0,5	5,8 ±0,9
СОЭ	6,0 ±0,7	5,8 ±0,8	5,9 ±0,6	4,4 ±1,0	4,6 ±0,5	4,8 ±0,8	5,9 ±0,7	4,4 ±1,0	5,4 ±0,6	5,2 ±0,7	5,6 ±0,5	6,9 ±1,5

Примечание: уровень значимости $p > 0,05$

Таблица 15 - Уровни IgE в сыворотках крови добровольцев, привитых исследуемыми вакцинами по сравнению с контролем

Сроки взятия проб	Уровни IgE, M ± m, МЕ/мл (норма - 1 – 165 МЕ/мл)			
	Вакцина Совигрипп (n = 110)	Вакцина Совигрипп (б/к) (n = 109)	Вакцина Гриппол (n = 79)	Плацебо (n = 30)
до введения	117,5 ± 16,1	90,0 ± 12,0	132,1 ± 26,1	125,8 ± 31,5
7 день	107,7 ± 14,1	98,9 ± 15,4	135,3 ± 25,7	154,5 ± 30,5
21 день	111,1 ± 14,8	91,1 ± 13,6	136,9 ± 27,2	149,8 ± 28,7

Примечание: уровень значимости $p > 0,05$

При использовании дисперсионного анализа для повторных наблюдений, гипотеза H_0 об отсутствии различий в уровне IgE у добровольцев до введения препарата, на 7 и на 21 сутки после введения не была отвергнута ($p > 0,05$). Из чего следует, что введение препаратов не приводит к повышению уровня IgE и, следовательно, не увеличивает риск развития аллергических реакций у людей 18-60 лет при отсутствии специфической непереносимости отдельных компонентов вакцины (например, куриного белка).

В целом полученные данные свидетельствуют о хорошей переносимости и высоком профиле безопасности вакцины Совигрип.

3.4.2. Иммуногенность вакцины Совигрипп

Иммуногенную активность вакцин оценивали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), исследуя парные сыворотки крови 267 добровольцев, взятые до вакцинации и через 21 день после иммунизации (из них 30 добровольцев получали плацебо и 237 – гриппозные вакцины). Данные еще трех добровольцев (1 – иммунизированный вакциной Совигрипп без консерванта; 1 - вакциной Совигрипп с консервантом и 1 – вакциной Гриппол) не были приняты к статистической обработке, вследствие присоединения интеркуррентной инфекции. Также не учитывались результаты добровольцев, принявших участие в I этапе исследования, где изучали только переносимость,

реактогенность и безопасность вакцины Совигрипп, за исключением добровольцев, получавших плацебо. Полученные результаты по иммуногенности вакцин Совигрипп и Гриппол представлены в таблице 16.

При использовании критерия Краскела-Уоллиса гипотеза H_0 о том, что уровни сероконверсии и серопротекции, а также фактор сероконверсии на 21 сутки после введения вакцины Совигрипп или Гриппол не отличались от контроля, была отвергнута ($p<0,05$) в отношении всех штаммов. Таким образом, было показано нарастание титра специфических антител на 21 сутки после вакцинации.

Как видно из таблицы, исследуемые формы вакцины Совигрипп способны обеспечить высокие уровни сероконверсии и серопротекции к штаммам вируса гриппа A(H1N1), A(H3N2) и B. Для вакцины Совигрипп с консервантом уровни сероконверсии составили:

1. к штамму A/Калифорния/07/09 (H1N1)v - 82,3 % (95%ДИ: 73,9-90,7%);
2. к штамму A/Висконсин/15/09 (H3N2) - 78,5 % (95%ДИ: 69,4-87,6%);
3. к штамму B/Брисбен/33/08 - 74,7 % (95%ДИ: 65,1-84,3%).

Для вакцины Совигрипп без консерванта уровни сероконверсии составили:

1. к штамму A/Калифорния/07/09 (H1N1)v - 82,3 % (95%ДИ: 73,9-90,7%);
2. к штамму A/Висконсин/15/09 (H3N2) - 78,5 % (95%ДИ: 69,4-87,6%);
3. к штамму B/Брисбен/33/08 – 77,2 % (95%ДИ: 68-86,4%).

Для вакцины Совигрипп с консервантом уровни серопротекции составили:

1. к штамму A/Калифорния/07/09 (H1N1)v - 77,2 % (95%ДИ: 68-86,4%);
2. к штамму A/Висконсин/15/09 (H3N2) - 70,9 % (95%ДИ: 60,9-80,9%);
3. к штамму B/Брисбен/33/08 - 77,2 % (95%ДИ: 68-86,4%).

Для вакцины Совигрипп без консерванта уровни серопротекции составили:

1. к штамму A/Калифорния/07/09 (H1N1)v - 70,9 % (95%ДИ: 60,9-80,9%);
2. к штамму A/Висконсин/15/09 (H3N2) - 70,9 % (95%ДИ: 60,9-80,9%);
3. к штамму B/Брисбен/33/08 – 74,7 % (95%ДИ: 65,1-84,3%).

Таблица 16 - Результаты исследования иммуногенности вакцин Совигрипп и Гриппол у добровольцев 18-60 лет

Препарат	Штамм вируса гриппа	Уровень сероконверсии		СГТ		Фактор сероконверсии	Уровень серопротек-ции		МУ 3.3.2.1758-03	СРМР ЕМЕА		
		абс.	%	День 0	День 21		абс.	%		1*	2**	3***
Совигрипп с консервантом (n = 79)	А/Калифорния/07/09 (H1N1)v	65	82,3	7,1	70,1	9,9	61	77,2	+	+	+	+
	А/Висконсин/15/09 (H3N2)	62	78,5	7,2	52,5	7,3	56	70,9	+	+	+	+
	В/Брисбен/33/08	59	74,7	9,6	64,2	6,7	61	77,2	+	+	+	+
Совигрипп без консерванта (n = 79)	А/Калифорния/07/09 (H1N1)v	65	82,3	8,0	62,0	7,8	56	70,9	+	+	+	+
	А/Висконсин/15/09 (H3N2)	62	78,5	7,0	51,1	7,3	56	70,9	+	+	+	+
	В/Брисбен/33/08	61	77,2	9,2	69,5	7,6	59	74,7	+	+	+	+
Гриппол (n = 79)	А/Калифорния/07/09 (H1N1)v	63	79,7	7,2	65,4	9,1	59	74,7	+	+	+	+
	А/Висконсин/15/09 (H3N2)	60	75,9	7,2	42,2	5,9	52	65,8	+	+	+	-
	В/Брисбен/33/08	59	74,7	9,5	55,8	5,9	59	74,7	+	+	+	+
Плацебо (n = 30)	А/Калифорния/07/09 (H1N1)v	3	10,0	6,0	8,1	1,4	3	10,0	-	-	-	-
	А/Висконсин/15/09 (H3N2)	5	16,7	6,0	8,3	1,4	1	3,3	-	-	-	-
	В/Брисбен/33/08	3	10,0	8,9	10,9	1,2	1	3,3	-	-	-	-

* - Уровень сероконверсии > 40 %; ** - Фактор сероконверсии > 2,5; *** - Уровень серопротекции > 70 %

При этом вакцина Совигрипп не уступала, а по сероконверсии даже превышала значения, полученные по препарату сравнения - вакцине Гриппол.

Для вакцины Гриппол уровни сероконверсии составили:

1. к штамму А/Калифорния/07/09 (H1N1)v - 79,7 % (95%ДИ: 71-88,4%);
2. к штамму А/Висконсин/15/09 (H3N2) - 75,9 % (95%ДИ: 66,5-85,3%);
3. к штамму В/Брисбен/33/08 - 74,7 % (95%ДИ: 65,1-84,3%).

Для вакцины Гриппол уровни серопротекции составили:

1. к штамму А/Калифорния/07/09 (H1N1)v - 74,7 % (95%ДИ: 65,1-84,3%);
2. к штамму А/Висконсин/15/09 (H3N2) - 65,8 % (95%ДИ: 55,3-76,3%);
3. к штамму В/Брисбен/33/08 – 74,7 % (95%ДИ: 65,1-84,3%).

Повышение средних геометрических титров антител на 21 день по сравнению с исходным уровнем (фактор сероконверсии) в основном было несколько выше у вакцины Совигрипп (9,9; 7,3; 6,7 и 7,8; 7,3; 7,6, соответственно), чем у вакцины Гриппол (9,1; 5,9; 5,9, соответственно).

При использовании критерия Краскела-Уоллиса для показателей уровня сероконверсии, фактора сероконверсии и уровня серопротекции гипотеза H_0 об отсутствии статистически значимых различий этих показателей между группами, получавшими гриппозные вакцины, не была отвергнута ($p > 0,05$), что говорит о том, что вакцина Совигрипп (как с консервантом так и без него) не уступает по иммуногенности вакцине Гриппол и может использоваться для эффективной профилактики гриппа у лиц от 18 до 60 лет.

Таким образом, низкая частота местных и системных реакций свидетельствует о хорошей переносимости и слабой реактогенности вакцины Совигрипп. Данные физикального и неврологического осмотров, а также клинического и биохимического анализов крови и анализа мочи не выявили патологических изменений, что указывает на высокий профиль безопасности препаратов. Анализ динамики уровня IgE показал отсутствие аллергизирующего действия вакцин с адъювантом Совидон.

Вакцина Совигрипп – высокоиммуногенна и удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к инактивированным гриппозным сезонным вакцинам Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (МУ 3.3.2.1758-03) и международным требованиям (CPMP EMEA). При этом она ни по одному показателю иммуногенности не уступала вакцине Гриппол, а по некоторым даже превосходила ее.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обязательной характеристикой любой современной вакцины является ее низкая реактогенность. В настоящее время практически все инактивированные и живые гриппозные вакцины производятся с использованием развивающихся куриных эмбрионов, поэтому готовый препарат требует тщательной очистки от белков субстрата (яичного белка), который может приводить к аллергическим реакциям (Ершебулов и др., 2010; Palache et al., 1997). При получении субъединичных вакцин также стремятся к уменьшению содержания липидов наружной оболочки вирусов, т.к. высокое их содержание может стимулировать повышенную выработку интерферона, что в свою очередь может привести к развитию гриппоподобного синдрома (Алсынбаев и др., 2012; Arnaud, 2002; Kim et al., 2015).

Другой важнейший критерий качества вакцин – их иммуногенность, то есть способность формировать специфический иммунитет против вируса гриппа. Наибольше значение при формировании иммунитета против гриппа играют поверхностные антигены вируса – гемагглютинин и нейраминидаза. Антитела к гемагглютинину препятствуя прикреплению вируса к мембранным рецепторам клеток-мишеней и, нейтрализуя вирусную инвазивность, способствуют повышению специфической резистентности организма к возбудителю гриппа. В свою очередь антитела к нейраминидазе нарушают процессы репликации вируса, что играет существенную роль в снижении тяжести гриппозной инфекции и предотвращении развития постгриппозных осложнений (Дьяков, 2014; Заплатников и др., 2001).

Данные по электрофорезу показали, что исследуемые образцы экспериментальной вакцины содержат высокие концентрации гемагглютинина и нейраминидазы (95,5 % - 98,6 % в зависимости от штамма) с незначительной примесью М-белка (1,4 % - 4,5 % в зависимости от штамма), что согласуется с данными, полученными *Beyer et al.*, по применяемым инактивированным

гриппозным вакцинам. Высокая степень очистки экспериментальной гриппозной вакцины от «балластных» включений призвана обеспечить низкую реактогенность, а высокая степень концентрации антигенов, участвующих в становлении проективного иммунитета, - необходимую иммуногенность.

За последние десятилетия произошли значительные изменения в технологии производства вакцинных препаратов. В результате чего многие вакцины, которые проходят в настоящее время клинические исследования, значительно отличаются от уже существующих вакцин.

Основными направлениями в разработке новых гриппозных вакцин являются:

- поиск новых и усовершенствование существующих технологий производства вакцин;
- снижение реактогенности и повышение профиля безопасности вакцин для расширения круга вакцинируемых;
- снижение содержания вирусного антигена в вакцинирующей дозе;
- повышение иммуногенности.

Перспективным решением большинства этих проблем является введение в состав вакцины иммуноадъюванта. Воздействие адъювантов на иммунологические реакции в основном обусловлено двумя их свойствами: способностью удерживать антиген в том месте, где он экспонируется лимфоцитами (эффект «депо») и способностью вызывать синтез цитокинов, регулирующих лимфоцитарные функции (Ройт и др., 2000).

Иммуноадъюванты способны не только вызывать мощный иммунный ответ на различные антигены, но и эффективно управлять им, избирательно воздействуя на лимфоциты Тх1 (клеточный иммунный ответ), Тх2 (гуморальный иммунный ответ), цитотоксический Т-клеточный ответ, а также неспецифический иммунитет. Использование адъювантов позволяет уменьшить дозу антигена в вакцине, увеличить иммуногенность «слабых» антигенов, предотвратить конкуренцию антигенов в комбинированных вакцинах,

увеличить скорость развития и продолжительность иммунного ответа у привитых (Haensler, 2013).

При создании адъювантных вакцин необходимо, чтобы они отвечали следующим требованиям: адъювант не должен вызывать поликлональную стимуляцию, приводящую к перегрузке иммунной системы, усиливать реактогенность, тератогенность, индукцию аутоиммунных процессов и др. (Лусс, 2013).

Ввиду всего вышеизложенного, была поставлена задача показать, что введение препарата Совидон (сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона) в состав субъединичной гриппозной вакцины, не вызовет увеличения ее реактогенности и ухудшения профиля безопасности. Кроме того, нам предстояло доказать, что изучаемая вакцина по своей эффективности (иммугенности), не уступает или даже превосходит широкоприменяемую отечественную гриппозную вакцину того же типа (Гриппол Вакцина гриппозная тривалентная полимер-субъединичная жидкая).

Считается, что прикрепление антигенов к частицам адъюванта позволяет значительно повысить их иммуногенность, вследствие того, что:

- Размер антигена увеличивается (соответственно, появляется/усиливается ответ на слабые антигены);
- Высвобождение антигена в организме существенно пролонгируется (эффект депонирования);
- Поверхность частицы с антигеном представляет собой множество молекул антигена, положение которых фиксировано в пространстве. В растворе свободного антигена – его молекулы не фиксированы, а свободно движутся в объеме растворителя, что существенно сказывается на взаимодействии антигена с клеточными рецепторами. Связывание частицы, покрытой молекулами антигена с клеточными рецепторами, сопровождается сближением клеточных рецепторов и образованием их кластеров;

- Практически любая частица не инертна в отношении клеток человека и животного и клетки обязательно реагируют на контакт с частицей. Не является исключением и частица с прикрепленным антигеном, при этом реакция клеток человека и животных на частицу с антигеном существенно отличается от реакции на растворимую форму того же антигена. Реакции клеток зависят от природы клеток и свойств частиц: их размеров, заряда поверхности, наличия реакционноактивных и мембраноактивных групп, биодеградируемости. Типичными реакциями клеток на частицы покрытые антигеном, являются эндоцитоз или фагоцитоз, дестабилизация внутриклеточных везикул, активация инфламмасомы, изменение синтеза цитокинов, изменение активности ферментов, изменение экспрессии рецепторов, а также апоптоз (Атауллаханов и Хаитов, 2011).

В ряде работ показано (Петров и Хаитов, 2003; Хаитов и Пинегин, 2005), что связывание антигенов с синтетическими водорастворимыми полимерами приводит к формированию принципиально новых иммуногенных частиц. Такие иммуноадъюванты способны заменить масляные композиции, что немаловажно, учитывая их высокую стоимость (около 1 доллара США за 1 мл). Большинство исследований по созданию конъюгатов антиген-полимер выполнено на базе довольно узкого круга макромолекул. В основном используются полимеры акриловой кислоты, винилпирролидона и винилпиридина. Иммуногенные частицы формируются путем ковалентного связывания антигена с полимером (т.е. идет процесс конъюгации), при этом очень важно сохранить нативную структуру антигена (Анненков и др., 1990; Анненков и др., 1998; Анненков и др., 2001; Даниловцева и др., 2004).

В ходе проведенного электронно-микроскопического исследования было обнаружено, что в отличие от гидроксида алюминия, оба полиэлектролита – Совидон и Полиоксидоний – формировали наноразмерные конгломераты с вирусными субъединицами в составе вакцины. Преимуществом Совидона по сравнению с Полиоксидонием является его способность к образованию

наночастиц размером 80–350 нм, сходных с виросомами, в которых были локализованы поверхностные антигены вируса гриппа, что позволяет считать Совидон перспективным адъювантом для создания инактивированной гриппозной вакцины.

В настоящее время ведущая роль в создании протективной защиты против сезонного гриппа отводится гуморальному ответу. Однако в последнее время накапливаются данные о важности и клеточного ответа, направленного против консервативных участков молекул вируса гриппа и приводящего к кросс-реактивности, что особенно важно в условиях угрозы пандемии (Hancock et al., 2009). Считается, что для захвата разных по размеру частиц клетки используют разные механизмы эндоцитоза. Нанометровые частицы предпочтительно захватываются дендритными клетками и накапливаются в дренирующих лимфатических узлах. Оптимальными для индукции Тх1 и ЦТЛ ответов являются частицы от 20 до 100 нм, близкие по своим размерам к вирусным частицам (Allsopp et al., 1996; Mottram et al., 2007). Более крупные частицы индуцируют реакцию Тх2 (гуморальный ответ) (Gamvrellis et al., 2004). Исходя из вышесказанного, было сделано предположение, что показанная с помощью электронной микроскопии способность Совидона к образованию комплексов с гемагглютинином размером 80 – 350 нм будет способствовать преимущественно развитию гуморального иммунного ответа, играющего важнейшую роль при формировании резистентности и снижении тяжести заболевания гриппом. Однако, наличие в препарате нанночастич менее 100 нм не исключает возможность индукции клеточного иммунного ответа.

Одной из основных задач при планировании доклинических исследований по изучению новых гриппозных вакцин является выбор оптимальной экспериментальной животной модели.

Как правило, первые, пилотные исследования инактивированных гриппозных вакцин проводят на мышах, а при получении положительных результатов повторяют исследования на животных, у которых течение

заболевания и становление протективного иммунологического ответа подобно таковой у человека (Миронов, 2012).

Хорьки являются наиболее чувствительными животными к вирусам гриппа человека и, в отличие от мышей, обладают более высокой восприимчивостью к ним. Картина заболевания гриппом у хорьков весьма сходна с таковой у человека (Maher & De Stefano, 2004; Stark et al., 2013). Кроме того, иммунизация хорьков гриппозной вакциной предупреждает заболеваемость гриппом и вызывает подъем титра специфических антител в сыворотке крови животных (Ducatez et al., 2013; Fang et al., 2010; Stark et al., 2013).

Поэтому на первом этапе была проведена сравнительная оценка антигенной активности двух адъювантных вакцин с различным содержанием Совидона и аналогичной вакцины без адъюванта при двукратной внутримышечной иммунизации мышей. Показано увеличение СГТ сывороточных антител в группе вакцины с адъювантом в дозе 250 мкг в 2,8; 2,5 и 1,4 раз, а в группе вакцины с адъювантом в дозе 500 мкг - в 4,5; 2,5 и 1,6 раз в отношении вирусов гриппа A(H1N1); A(H3N2) и B соответственно.

Во второй серии опытов проводили изучение безопасности и иммуногенности экспериментальных вакцин с различным содержанием адъюванта и вакцины Гриппол при однократной внутримышечной иммунизации хорьков. Наблюдение в течение эксперимента (21 день) не выявило отклонений в поведении и соматическом статусе животных опытных групп по сравнению с контрольной группой, получавшей 0,5 мл физиологического раствора. Снижения массы тела не отмечалось. Температура тела хорьков в опытных и контрольных группах в течение всего срока наблюдения оставалась в пределах видовой нормы.

В результате проведенных макроскопических и гистологических исследований не обнаружено никаких патологических изменений у хорьков, связанных с введением вакцины. Все выявленные патологии носили

неспецифический характер и наблюдались во всех группах, в том числе и в контрольной.

Обнаруженная вариабельность в строении зародышевых центров в фолликулах селезенки отражала индивидуальные иммунологические особенности. При этом было показано, что у животных получавших гриппозные вакцины, зародышевые центры в фолликулах селезенки были более выражены, чем у животных контрольной группы. Полученные данные согласуются с другими исследованиями на лабораторных животных, где было показано, что иммунизация гриппозными вакцинами лабораторных животных приводит к увеличению площади герминальных центров фолликулов и отражает способность к стимуляции антителогенеза и усилению формирования Т-клеточного ответа (Kulkarni et al., 2014; Zhang et al., 2009; Chattaraj et al., 1999).

На момент вакцинации у всех хорьков титр специфических антител к вирусу гриппа типа А и В в РТГА был ниже 1:10. На 21 сутки иммуногенность вакцины Совигрипп (Совидон 500 мкг) была достоверно выше, чем вакцины Совигрипп (Совидон 250 мкг) и вакцины Гриппол в отношении штамма вируса гриппа типа A(H3N2) ($p < 0,05$; критерий Манна-Уитни).

Кроме того, вакцина Совигрипп с содержанием адъюванта 500 мкг обеспечивала более высокий уровень серопротекции (достижение титра 1:40 на 21 сутки после введения препарата): у 50% хорьков к вирусу гриппа типа A(H1N1), у 95% - к A(H3N2) и 30% – к В. В то время как для вакцины Совигрипп с содержанием адъюванта 250 мкг – 25%, 85% и 10%, соответственно. Для вакцины Гриппол эти же показатели составили – 30%, 70% и 50%.

Таким образом, по данным изучения иммуногенной активности и безопасности экспериментальных вакцин для дальнейших исследований была выбрана вакцина с дозой адъюванта Совидон, равной 500 мкг.

Кроме исследований, описанных в работе проводились эксперименты на лабораторных животных (нелинейные белые мыши и крысы, мыши линии BALB/c, морские свинки, кролики породы Шиншилла, неполовозрелые нелинейные белые крысы), где было показано отсутствие острой и хронической токсичности вакцины Совигрипп, местно-раздражающего, иммунотоксического и аллергизирующего действия, а также пирогенности, репродуктивной и эмбриональной токсичности (данные не приводятся).

Такой высокий профиль безопасности был ожидаем, так как инактивированные субъединичные гриппозные вакцины являются наименее реактогенными (ВОЗ, 2012), а препарат Совидон (сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N – винилпирролидона), включенный в состав вакцины даже при дозе 5000 мг/кг не вызывал гибели мышей F1($СВА^{x}С_{57}В_{1}$) (Кедик и др., 1993). При подкожном введении мышам 500 мг/кг отсутствовали признаки раздражающего действия препарата и выпадение волосяного покрова (Кедик и др., 1993).

Доклинические исследования не могут гарантировать безопасность лекарственного препарата при его использовании в клинической практике на 100 %. При исследовании на животных не всегда проявляются побочные реакции, возникающие у человека. Изучение общей токсичности препарата на животных позволяет предсказать переносимость его человеком только на 65-70 % (Лепахин, 2008). Это связано с видовыми различиями человека и животных. Поэтому до внедрения препарата на фармацевтический рынок необходимо подтвердить безопасность и эффективность нового препарата в клинических исследованиях. Безопасность вакцин исследуется на ограниченной группе людей в рамках испытания реактогенности, безопасности и специфической активности новой вакцины.

Проведенное клиническое исследование вакцины Совигрипп, с участием добровольцев в возрасте 18-60 лет (всего 330 добровольцев) не выявило патологических изменений по данным физикального и неврологического

осмотров, а также клинического и биохимического анализов крови и анализа мочи.

К нормальным вакцинальным реакциям относят местные и общие реакции, которые, как правило, проходят в течение 1-2 суток без назначения терапии (Медуницын и Покровский, 2005).

Зарегистрированные местные и системные реакции имели слабую степень выраженности. Частота местных и системных реакций у добровольцев, получавших вакцины Совигрипп, Гриппол или плацебо не имела статистически значимых отличий. Таким образом, можно говорить о хорошей переносимости и низкой реактогенности исследуемых вакцин, что согласуется с результатами мета-анализа показавшего, что субъединичные вакцины, имеющие в составе только поверхностные протективные белки характеризуются низкой частотой местных и системных реакций (Chaloupka et al., 1996). Снижение дозы антигена также обеспечивает высокий профиль безопасности (Лусс и Костинов, 2009).

Следует также отметить преобладание местных реакций в структуре всех выявленных нежелательных явлений после введения вакцины Совигрипп (67 %), которые в 100 % случаев были представлены появлением кратковременного дискомфорта (болезненности) в месте введения. Аналогичная картина наблюдалась и на введение вакцины Гриппол – 83,3 % местные реакции, из них в 80,0 % - кратковременный дискомфорт (болезненность) в месте введения, 20,0 % - гиперемия. Все выявленные нежелательные явления проходили в течение 1-2 суток без назначения терапии, что позволяет отнести их к нормальным вакцинальным реакциям, учитывая отсутствие статистически значимых отличий от контрольной группы по частоте возникновения реакций.

Подобный профиль поствакцинальных реакций наблюдали даже при введении безадъювантной субъединичной вакцины Агриппал, где также наблюдали боль в месте инъекции слабой или умеренной степени выраженности (Szymczakiewicz-Multanowska et al., 2012). Наиболее

распространенными нежелательными реакциями на введение адъювантной гриппозной вакцины с MF59 были: припухлость в месте инъекции и миалгия. Они были слабой степени и исчезали в течение нескольких дней (Schultze et al., 2008). Покраснение и другие местные реакции также наблюдались после введения вакцины с адъювантом ASO3 (Glica et al., 2011).

В настоящее время доказана роль IgE в патогенезе тяжелых аллергических осложнений, развивающихся по первому типу гиперчувствительности. В основе этого процесса лежит активация Тх2 и продукция цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13, с последующим синтезом IgE-антиген, имеющих высокое сродство к тучным клеткам и базофилам. Антиген вступает во взаимодействие с фиксированными на тучных клетках комплексами IgE-антиген, что приводит к активации клеток и секреции медиаторов аллергических реакций (гистамина, серотонина и др.) (Гущин, 1998; Cell & Coombs, 1975). Поэтому определение уровня IgE, после введения того или иного вещества, важно для прогнозирования и предотвращения тяжелых аллергических осложнений.

Анализ динамики уровня IgE не показал статистически значимых отличий по сравнению с начальными данными ($p > 0,05$), а, следовательно, введение вакцины Совигрип не увеличивает риск развития аллергических реакций у практически здоровых лиц в возрасте 18-60 лет при отсутствии специфической непереносимости отдельных компонентов вакцины (например, куриного белка).

Иммуногенную активность вакцин оценивали в реакции торможения гемагглютинации, исследуя парные сыворотки крови, взятые до вакцинации и через 21 день после иммунизации.

Наиболее объективную оценку иммунологической эффективности можно получить при вакцинации людей, не имеющих антител к антигенам вакцины. С этой целью до начала исследования проводили скрининг сывороток крови добровольцев на присутствие в них специфических антител. В исследование

брали только добровольцев с титрами антител к вирусам гриппа типа А(H1N1 и H3N2) и типа В в РТГА не выше 1:20.

Эффективность вакцины определяется способностью вызывать иммунитет у привитого и тем самым предупреждать заболеваемость. Гуморальный иммунный ответ достаточно полно отражает защитный эффект инактивированных гриппозных вакцин (Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2005). Доказано, что у людей титр специфических антител к гемагглютининам вируса гриппа не менее 1:40 является защитным и предупреждает заболеваемость гриппом (Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2005). На этом показателе основаны официальные требования, предъявляемые к иммунологической эффективности вакцин для профилактики сезонного гриппа (МУ 3.3.2.1758-03 от 2005 и CPMP EMEA от 2001 г.). Таким образом, показатели гуморального иммунитета позволяют достаточно достоверно оценивать эффективность гриппозных вакцин.

Иммуногенность инактивированных вакцин оценивали в РТГА по фактору сероконверсии, величине среднегеометрического титра (СГТ), уровням сероконверсии и серопротекции в сыворотках крови привитых в соответствии с критериями CPMP EMEA (2001 г.) и МУ 3.3.2.1758-03, которые представлены в соответствующей главе Материалы и методы.

Однократная внутримышечная иммунизация добровольцев вакциной Совигрипп способна обеспечить высокие уровни сероконверсии и серопротекции по всем трем штаммам (A(H1N1); A(H3N2) и B). При этом вакцина Совигрипп не уступала, и даже превосходила, по этим показателям вакцину Гриппол.

Повышение средних геометрических титров антител на 21 день по сравнению с исходным уровнем (фактор сероконверсии) в основном было также несколько выше у вакцины Совигрипп, чем у вакцины Гриппол.

Исследования показывают, что в среднем эффективность по предотвращению заболевания гриппом у взрослых для инактивированных вакцин, отвечающих современным критериям, составляет около 70 % (Monto et al., 2009; Ohmit et al., 2006). К этим критериям относятся, следующее:

- число лиц с 4-кратным или более увеличением титра антител (сероконверсия) должна быть более 40 %;

- увеличение среднегеометрического титра антител более чем в 2,5 раза;

- процент лиц с защитным титром антител не менее 1:40 должен быть более 70% (Лонская и др., 2014).

Уровни сероконверсии к штаммам вируса гриппа A(H1N1), A(H3N2) и B для вакцины Совигрипп с консервантом составили 82,3%, 78,5%, 74,7% и без консерванта - 82,3%, 78,5%, 77,2%, соответственно; а уровни серопротекции - 70,9%, 70,9%, 74,7% для вакцины с консервантом и 70,9%, 70,9%, 74,7% для вакцины без консерванта, не уступая, и даже превышая соответствующие значения для препарата сравнения вакцины Гриппол (уровни сероконверсии: 79,7%, 75,9%, 74,7% и уровни серопротекции: 74,7%, 65,8%, 74,7%). Повышение средних геометрических титров антител на 21 день по сравнению с исходным уровнем (фактор сероконверсии) было несколько выше у вакцины Совигрипп, чем у вакцины Гриппол.

Таким образом, можно с уверенностью полагать, что протективный потенциал вакцины Совигрипп находится на уровне современных инактивированных вакцин.

На основании результатов проведенных исследований была разработана адъювантная инактивированная гриппозная вакцина Совигрипп. Исследования на животных, показали, что вакцина Совигрипп при введении лабораторным животным, в том числе неполовозрелым, обладает хорошей переносимостью, безопасностью и высокой антигенной активностью. Кроме того, на лабораторных животных было обнаружено отсутствие у вакцины аллергизирующих свойств, иммунотоксичности, репродуктивной и

эмбриональной токсичности. В конце 2010 г. - начале 2011 г. были проведены клинические исследования на ограниченном и расширенном контингенте добровольцев в возрасте 18-60 лет, в которых были подтверждены хорошая переносимость, низкая реактогенность, высокий профиль безопасности и выраженная иммуногенность вакцины Совигрипп (вне зависимости от наличия консерванта). На основании полученных данных доклинических и клинических исследований оформлена нормативная документация (фармакопейная статья предприятия, инструкция по применению), разработан регламент производства, зарегистрирована и разрешена к применению на территории РФ инактивированная вакцина Совигрипп для профилактики сезонного гриппа (регистрационное удостоверение № ЛП-001836 от 13.09.2012 г.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе выполнения работы было разработано несколько экспериментальных серий инактивированной тривалентной субъединичной гриппозной вакцины с различными адъювантами (Совидон, Полиоксидоний, гидроксид алюминия).

Проведенный анализ полипептидного состава экспериментальных вакцин методом электрофореза в ПААГ подтвердил высокое содержание гемагглютинина и нейраминидазы. Молекулярная масса полипептидов вируса гриппа в составе экспериментальных субъединичных вакцин не отличалась от молекулярной массы полипептидов входящих в состав цельного вириона вируса гриппа. В отличие от концентрата цельновирионного вируса гриппа в экспериментальных вакцинах отсутствовал нуклеопротеин, а примесь М-белка была не значительной (до 5 %). Таким образом, исследуемые образцы содержали необходимые антигены для создания инактивированной субъединичной вакцины против сезонного гриппа в достаточно высокой

концентрации и степени очистки, чтобы достигнуть желаемого уровня безопасности и иммуногенности.

На основании электронно-микроскопических исследований показано наличие взаимодействия субъединиц вируса гриппа с адъювантами-полиэлектролитами (Совидон и Полиоксидоний). При введении в состав вакцины адъюванта Совидон были обнаружены конгломераты, напоминающие собой вирусоподобные частицы размером 80 – 350 нм, несущие биологический материал (гемагглютинины размером около 10 нм). В настоящее время считается, что частицы крупнее 100 нм индуцируют реакцию Тх2 (гуморальный ответ) (Gamvrellis et al., 2004). Исходя из вышесказанного, было сделано предположение, что образование выявленных комплексов будет способствовать развитию гуморального иммунного ответа, играющего важнейшую роль при формировании резистентности и снижении тяжести заболевания гриппом.

В экспериментах на кроликах и хорьках была показана безопасность экспериментальных вакцин с добавлением Совидона. По результатам иммуногенности, полученной на мышах и хорьках, в качестве оптимальной дозы Совидона в составе инактивированной гриппозной вакцины выбрана следующая концентрация - 500 мкг на дозу препарата (0,5 мл).

Результаты по безопасности и иммуногенности проведенных исследований позволили перейти к следующему этапу – клиническому исследованию вакцины Совигрипп с участием добровольцев в возрасте 18-60 лет.

В клинических исследованиях с участием добровольцев в возрасте 18-60 лет, были подтверждены хорошая переносимость, низкая реактогенность, высокий профиль безопасности и выраженная иммуногенность вакцины Совигрипп. Вакцина Совигрипп по критериям иммуногенности полностью соответствует требованиям, предъявляемым к инактивированным гриппозным сезонным вакцинам Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (МУ 3.3.2.1758-03) и международным

требованиям (CPMP EMEA, CPMP/EWP/1045/01). При этом изучаемая вакцина с новым адъювантом была сопоставима и по ряду показателей иммуногенной активности превосходила существующую на рынке вакцину того же типа Гриппол.

Полученные данные доклинических и клинических исследований позволили зарегистрировать вакцину Совигрипп для профилактики сезонного гриппа на территории РФ (регистрационное удостоверение № ЛП-001836 от 13.09.2012 г.).

ВЫВОДЫ

1. Исследуемая субъединичная гриппозная вакцина Совигрипп состоит более чем на 95 % из субъединиц гемагглютинина и нейраминидазы с незначительной примесью М-белка (менее 5 %), что свидетельствует о высокой степени очистки и концентрации ключевых антигенов вирусов гриппа.

2. Сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона (Совидон) взаимодействует с молекулами гемагглютинина вирусов гриппа, приводя к образованию конгломератов размером 80 – 350 нм.

3. В исследованиях на мышах и хорьках показана безопасность и высокая антигенная активность исследуемой гриппозной вакцины с адъювантом Совидон - 500 мкг и 250 мкг.

4. По результатам исследований на животных в качестве оптимальной, для включения в состав инактивированной гриппозной вакцины, была выбрана доза 500 мкг сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона (Совидон), обеспечивающая более высокую иммуногенную активность.

5. Данные, полученные в ходе клинических исследований с участием добровольцев 18-60 лет, показали, что инактивированная гриппозная вакцина с Совидоном (500 мкг/доза) – Вакцина Совигрипп - по профилю безопасности и иммуногенности сопоставима и по ряду показателей превосходит существующую на рынке вакцину того же типа Гриппол.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

абс.	абсолютные единицы
АЛТ	Аланинаминотрансфераза
АСТ	Аспартатаминотрансфераза
б/к	без консерванта
ВАК	Высшая аттестационная комиссия
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ГАЕ	гемагглютинирующая единица
ГФ	Государственная фармакопея
ДДС	додецилсульфат натрия
ИГВ	инактивированная гриппозная вакцина
ИЛ	интерлейкин
ИФА	иммуноферментный анализ
ИФН	интерферон
КИ	клинические исследования
КЦ	концентрат субъединиц
МУ	методические указания
ПААГ	полиакриламидный гель
РТГА	реакция торможения гемагглютинации
СГТ	среднее геометрическое титра
СОЭ	скорость оседания эритроцитов
трис	трис(гидроксиметил)аминометана (HOCH2)3CNH2
Тх	Т-хелперы
ФНО	фактор некроза опухоли
ACIP	Консультативный комитет по проблемам вакцинации (Advisory Committee on Immunization Practices)
CD	кластер дифференцировки (cluster of differentiation)
CpG	цитозин-гуанин островки (cytosine-guanine sites)
CPMP	Комитет по патентованным лекарственным препаратам (Committee for Proprietary Medicinal Products)

EMEA	Европейское медицинское агентство (European Medicine Agency)
EWP	Рабочая группа по качеству (Efficacy Working Party)
GCP	Надлежащая клиническая практика (Good Clinical Practice)
Ig	иммуноглобулин (Immunoglobulin)
IMX	ISCOMATRIX®
MCP-1	моноцитарный хемоатрактантный белок (Monocyte Chemoattractant Protein 1)
MDCK	клетки почек кокер-спаниеля (Madin-Darby canine kidney cells)
MHC	главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)
NIBSC	Национальный институт биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological Standards and Control)
NA	нейраминидаза (neuraminidase)
NK	натуральные (естественные) киллеры (natural killer cells)
HA	гемагглютинин (haemagglutinin)
papMV	вирус мозайки папаи (papaya mosaic virus)
PERC-6	клетки сетчатки человека
RDE	рецептор-разрушающий энзим (Receptor Destroying Enzyme)
Vero	клетки почек африканской зеленой мартышки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. XII Государственной фармакопея Российской Федерации : Часть 1 / «Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с. : ил. – ISBN 978-5-9901447-1-2.
2. Пат. 2446824 C2 Российская Федерация, МПК A61K39/145 (2006.01), A61K39/385 (2006.01), A61K31/79 (2006.01), A61P31/14 (2006.01) Вакцина против гриппа и способ ее получения / М.М. Алсынбаев, Н.В. Загидуллин, С.А. Кедик ; патентообладатель ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России. - № 20101209770/15 ; заявл. 20.07.2010 ; опубл. 10.04.2012. Бюл. № 10 -9 с. : ил.
3. Анненков, В.В. Интерполимерные комплексы поли-5-винилтетразола и поли-1-винилазолов / В.В. Анненков, Н.Л. Мазяр, В.А. Круглова // Высокомолекулярные соединения, Серия А. - 2001. - Т. 43. - № 8. - С. 1308-1314.
4. Анненков, В.В. Синтез и свойства сополимеров 1-винил-4,5,6,7-тетрагидроиндола с малеиновой кислотой / В.В. Анненков, Е.Н. Даниловцева, А.И. Михалева // Высокомолекулярные соединения, Серия Б. – 1998. – Т. 40. - № 2. - С. 366-368.
5. Атауллаханов, Р.И. Адъюванты в составе вакцин. Сообщение 1. Микро- и наночастицы / Р.И. Атауллаханов, Р.М. Хаитов // Иммунология. – 2011. - №1. – С. 37-45.
6. Атьков, О.Ю. Фармакоэкономическая эффективность вакцинации против гриппа / О.Ю. Атьков, А.В. Азаров, Д.А. Жуков // Вакцинация. – 2008. - № 4. - с. 13–16.
7. Бурцева, Е.И. Опыт вакцинопрофилактики гриппа у лиц пожилого возраста. Сообщение I. Реактогенность и иммуногенность инактивированных гриппозных вакцин / Е.И. Бурцева, А.Н. Слепушкин, Е.Н. Власова и др. // Журн. Микробиол. - 2000. - № 5. - С. 44-45.
8. Волкова, О.В. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М. : Медицина, 1982. – 304 с. : ил. - ISBN 5-1470361-А
9. Гендон, Ю.З. Проблемы профилактики гриппа с помощью вакцин / Ю. З. Гендон, Ю. М. Васильев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. - № 4. – С. 115-124.
10. Гендон, Ю.З. Вакцины и химиопрепараты для профилактики гриппа / Ю.З. Гендон // Вопросы вирусологии. — 2007. — № 1. — С. 4-10.

11. Гендон, Ю.З. Проблемы профилактики гриппа у маленьких детей / Ю. З. Гендон // Вопросы вирусологии. – 2006. - № 2. – С. 4-10.
12. Гущин, И.С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль / И.С. Гущин. – М. : Фармарус Принт, 1998. – 250 с. : ил. - ISBN 5-901029-04-6.
13. Даниловцева, Е.Н. Сополимеры 1-винилимидазола и акриловой кислоты для биосепарации / Е.Н. Даниловцева, В.В. Анненков, А.И. Михалева, Б.А. Трофимов // Высокомолекулярные соединения, Серия А. – 2004. – Т. 46. - № 2. – С. 1-6.
14. Донина, С.А. Местный иммунный ответ на живую холодоадаптированную реассортантную гриппозную вакцину у детей, взрослых и престарелых лиц / С.А. Донина, А.Н. Найхин, Е.П. Григорьева и др. // Вопросы вирусологии. - 2003. - № 2. - С. 29-31.
15. Дьяков, И.Н. Вакцины последнего поколения для профилактики гриппа на фармацевтическом рынке России / И.Н. Дьяков // Ремедиум. – 2014. - № 9. - С. 44-46.
16. Дьяконова, В.А. Изучение механизма действия иммуномодулятора полиоксидония на клеточном и молекулярном уровнях на клетках периферической крови человека в условиях in vitro / В.А. Дьяконова, С.В. Дамбаева, Н.М. Голубева и др. // Физиология и патология иммунной системы . — 2004. — Т. 8. - № 2 . — С. 100-115.
17. Еженедельный эпидемиологический бюллетень / ВОЗ - 2012. - № 47. - Р. 461-476.
18. Ельшина, Г.А. Оценка эффективности гриппозной тривалентной полимер-субъединичной вакцины "Гриппол" / Г.А. Ельшина, М.А. Горбунов, В.И. Шерварли и др. // Журн. Микробиол. - 1998. - № 3. - С. 40-43.
19. Ершебулов, З.Д. Определение оптимальных параметров культивирования рекомбинантного штамма A/ASTANARG/5:3/2009 вируса гриппа / З.Д. Ершебулов, Е.О. Абдураимов, Ш.Ж. Рыскельдинова и др. // Биотехнология. Теория и практика. – 2010. - № 4. – С. 75-79.
20. Зайцев, А.А. Грипп: диагностика и лечение / А.А. Зайцев, А.И. Синопальников // РМЖ. - 2008. - Т. 16. - № 22. - С. 1494–1497.
21. Зайцев, А.А. Лечение острых респираторных вирусных инфекций / А.А. Зайцев // Лечащий врач. - 2008. - № 8. - С. 42–45.

22. Заплатников, А.Л. Эффективность вакцины Ваксигрипп у детей школьного возраста / А.Л. Заплатников, Коровина Н.А., Бурцева Е.И. и др. // Бюллетень «Вакцинация». – 2001. - № 5(17). – С. 16-20.
23. Калистратов, В.Г. Противолучевые и другие биологические свойства сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона / В.Г. Калистратов, С.А. Кедик, В.И. Свергун // Медицинская радиология. - 1993. - Т. 38. - № 10. - с. 21-25.
24. Калистратова, В.С. К проблеме профилактики при помощи иммуномодуляторов отдаленных последствий, вызванных внутренним облучением / В.С. Калистратова, А.А. Иванов, П.Г. Нисимов / Радиационная биология. Радиоэкология. - 2001. - Т. 41. - № 1. - с. 104-112.
25. Пат. 2000004 С Российская Федерация, МПК [5] C08F226/10, A61K31/79 C08F226/10, C08F226:06. Сополимеры 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона, обладающие иммуностимулирующим действием / С.А. Кедик, Е.К. Федоров, В.И. Свергун и др. ; заявитель и патентообладатель фармацевтическая фирма «Ковидон». - № 05054762 ; заявл. 16.07.1992 ; опубл. 15.02.1993, Бюл. № 28. – 10 с. : ил.
26. Пат. 2015993 С1 Российская Федерация, МПК[5] C08F226/10, A61K31/79, C08F226/10, C08F226:06 Сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона, обладающий противоопухолевой активностью / С.А. Кедик, В.И. Свергун, Е.И. Ярцев и др. ; заявитель и патентообладатель фармацевтическая фирма «Ковидон» - № 5054916/05 ; заявл. 16.07.1992 ; опубл. 15.07.1994, Бюл. № 27-2000. – 10 с. : ил.
27. Пат. 2415876 С1 Российская Федерация, МПК C08F226/10 (2006.01), A61K31/79 (2006.01) Сополимеры на основе N-винилпирролидона / С.А. Кедик, В.И. Свергун, Ю.В. Черта и др. ; заявитель и патентообладатель С.А. Кедик. - № 2010105912/04 ; заявл. 19.02.2010 ; опубл. 10.04.2011, Бюл. № 10. – 10 с. : ил.
28. Пат. 2430932 С1 Российская Федерация, МПК C08F226/10 (2006.01), A61K31/79 (2006.01) Сополимеры 2-метил-5-винилпиридина и n-винилпирролидона, активирующие продуцирование интерлейкина-1, и их применение в качестве противораковых агентов / С.А. Кедик, А.В. Панов, М.А. Зайцев и др. ; заявитель и патентообладатель С.А. Кедик. - № 2010144324/04 ; заявл. 29.10.2010 ; опубл. 10.10.2011, Бюл. № 28. – 11 с. : ил.
29. Пат. 2430933 С1 Российская Федерация, МПК C08F226/10 (2006.01), A61K31/79 (2006.01) Сополимеры 2-метил-5-винилпиридина и N-

винилпирролидона, обладающие свойствами активаторов фагоцитоза / С.А. Кедик, А.В. Панов, М.А. Зайцев и др. ; заявитель и патентообладатель С.А. Кедик. - № 2010144325/04 ; заявл. 29.10.2010 ; опубл. 10.10.2011, Бюл. № 28. – 9 с. : ил.

30. Пат. 2459838 С1 Российская Федерация, МПК C08F226/10 (2006.01), A61K31/79 (2006.01) Сополимер, содержащий звенья N-винилпирролидона, 2-метил-5-винилпиридина и 4-винилпиридина / С.А. Кедик, А.В. Панов, Ю.В. Кочкина и др. ; заявитель и патентообладатель С.А. Кедик. - № 2011140410/04 ; заявл. 05.10.2011 ; опубл. 27.08.2012, Бюл. № 24. – 13 с. : ил.
31. Пат. 93027497 А Российская Федерация, МПК^{6} C08F226/06, C08F226/06, C08F226:10 Сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона, обладающий противолучевой активностью / С.А. Кедик, Г.В. Калистратов, В.И. Свергун и др. ; заявитель и патентообладатель фармацевтическая фирма «Ковидон» - № 93027497/04 ; заявл. 12.05.1993 ; опубл. 10.10.1996.
32. Киселев, О.И. Состояние разработки вакцин против вируса гриппа H5N1 в мире и в России / О.И. Киселев, Л.М. Цибалова, В.И. Покровский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2006. - № 5. - С.28-38.
33. Киселев, О.И. Химиопрепараты и химиотерапия гриппа / О. И. Киселев. – СПб. : ООО «Издательство «Росток»», 2012. – 272 с. - : ил. - ISBN 978-5-94668-101-8.
34. Клемпарская, Н.Н. Радиоактивные изотопы и иммунитет / Н.Н. Клемпарская, Г.А.Шальнова, В.Н. Мальцев. - М. : Атомиздат. - 1968. - 207 с.
35. Крамарь, Л.В. Современные возможности иммуномодулирующей и иммунокорригирующей терапии при инфекционных заболеваниях у детей / Л.В. Крамарь, О.А. Карпухина, Ю.О. Хлынина // Лекарственный вестник. - 2011. - № 3(43). - Т. 6. - С. 15-23.
36. Кузин, В.Б. Исследование клинической эффективности и переносимости препарата Антигриппин-Максимум при лечении ОРВИ (гриппа) / В.Б. Кузин, Л.В. Ловцова, А.Л. Барсук // Справочник поликлинического врача. – 2010. - № 1. – С. 3-7.
37. Кузьмина, Т.Ю. ОРВИ и грипп в эпидсезон 2009 года / Т.Ю. Кузьмина, Е.П. Тихонова, А.А. Упирова, и др. // Материалы II Ежегодного

всероссийского конгресса по инфекционным болезням. – 2010. – 29-31 марта. – 416 с.

38. Лебедев, В.А. Современные принципы лечения больных с абсцедирующими формами воспалительных заболеваний придатков матки / В.А. Лебедев, В.М. Пашков, И.А. Клиндухов // Трудный пациент. – 2010. – Т. 8. - № 8. - С. 4-8.
39. Лепахин, В.К. Разработка методов изучения и профилактики осложнений фармакотерапии : учебное пособие / В.К. Лепахин, А.В. Астахова, Е.А. Ушкалова и др. - М. : Изд-во РУДН, 2008. - 225 с. : ил.
40. Лонская, Н.И. Основные критерии оценки эффективности гриппозных вакцин / Н.И. Лонская, М.А. Горбунов, А.В. Рукавишникова и др. // Биопрепараты. – 2014. - №3(51). – С. 11-18.
41. Лусс, Л.В. Роль полиоксидония как иммуномодулятора и иммуноадъюванта при профилактике гриппа / Л.В. Лусс // Медицинский совет. – 2013. - № 8. – С. 50-54.
42. Лусс, Л.В. Проблемы терапии и профилактики гриппа: мифы об опасностях поствакцинальных реакций, результаты анализа поствакцинальных осложнений после прививки против гриппа у детей пермского края / Л.В. Лусс, М.П. Костинов // Иммунология. - 2009. - № 1. - С. 13-21.
43. Медуницын, Н.В. Вакцинология / Н.В. Медуницын. - 2-е изд., перераб. и доп. - М. : Триада-Х, 2004. - 448 с. : ил. - ISBN 5-8949-0008-6.
44. Медуницын, Н.В. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней: учебное пособие / Н.В. Медуницын, В.И. Покровский. - М. : ГЭОТАР−Медиа. – 2005. – 512 с. : ил. - ISBN 5-9704-0061-0.
45. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. В 2 ч. Ч. 2. Иммунобиологические лекарственные препараты / А.Н. Миронов. – М. : Гриф и К, 2012. – 536 с. - ISBN 978-5-8125-17667-0.
46. МУ 3.3.2.1758-03 // Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. Методические указания (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28.09.2003). - М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2005.

47. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2009 году : государственный доклад. - М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. - 2010. - 456 с.
48. Палаш, А. М. Субъединичная гриппозная вакцина: десятилетний опыт применения / А. М. Палаш // European Journal of Clinical Reseach. - 1992. - V. 3. - P. 117-138.
49. Петров, В.И. Прикладная фармаэкономика: учебное пособие / под ред. В.И. Петрова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 336 с. : ил. - ISBN 5-9704-0370-9.
50. Петров, Р.В. Вакцинация против гриппа: проблемы и успехи / Р.В. Петров // Лечащий врач. - 2007. - № 9. - С. 93-96.
51. Петров, Р.В. Конъюгированные полимер-субъединичные иммуногены и вакцины / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов // Вестник РАМН. – 2003. - № 1. - С. 10-14.
52. Петрович, И.К. Отдаленные последствия лучевых поражений / И.К. Петрович, Ю.И. Москалев, В.Ф. Сосова ; под ред. Ю. И. Москалева. - М. : Атомиздат, 1971. - С. 509.
53. Петухова, Н.В. Вирусоподобные частицы – новая стратегия для создания противогриппозных вакцин / Н.В. Петухова, П.А. Иванов, А.И. Мигунов // Вопросы вирусологии. – 2013. - № 58(2). – С. 10-14.
54. Пинегин, Б.В. Влияние иммуномодулятора на синтез интерферонов / Б.В. Пинегин, М.И. Варфоломеева // Лечащий врач. - 2010.- № 10. - С. 88-91.
55. Покровский, В.И. Пандемия – 2009. Новый вирус H1N1 / В.И. Покровский, О.И. Киселев. – СПб. : Изд-во «Росток», 2010. - 210 с.
56. Приказ Минздрава РФ от 19.06.2003 N 267 "Об утверждении Правил лабораторной практики" (Зарегистрировано в Минюсте РФ 25.06.2003 N 4809)
57. Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл ; пер с англ. – М. : Мир, 2000. – 592 с. : ил. - ISBN 5-03-003305-X.
58. Семенов, Б.Ф. Концепция отложенной смерти при гриппе и тактика вакцинопрофилактики инфарктов, инсультов и летальных исходов при этой инфекции / Б.Ф. Семенов // РМЖ. - 2003. - Т. 11. - № 22. - С. 1266–1267.
59. Сополимер 5-изопропенилтетразола и N-винилпирролидона, обладающий свойствами иммуноадъюванта поверхностного антигена вирусного гепатита В : а. с. 1578143 СССР МПК^{5} А61К31/79 / В.В.

Анненков, С.И. Лещук, В.А. Круглова и др. (СССР) // заявл. 18.07.88 ; опубл. 15.07.90, Бюл. № 26. – 2 с. : ил.

60. Убоженко, И.В. Анализ вспышки высокопатогенного гриппа A(H1N1) в г. Владивостоке в 2009 году / И.В. Убоженко, А. И. Симакова, Н.А. Боровская и др. // Материалы II Ежегодного всероссийского конгресса по инфекционным болезням – 2010. – 29-31 марта – 416 с.
61. Хаитов, Р.М. Основные принципы иммуномодулирующей терапии / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2000. - № 1. С. 9-16.
62. Хаитов, Р.М. Вакцины нового поколения и проблемы биобезопасности / Р.М. Хаитов // Цитокины и воспаление. - Т. 4. - № 3. - 2005. - С. 70-75.
63. Хаитов, Р.М. Современные представления о механизмах действия полиоксидония / Р.М. Хаитов, Б В. Пинегин // Иммунология. – 2005. - № 4. – С. 197-199.
64. Шведов, В.Л. Проблемы нормирования ионизирующих излучений в условиях воздействия модифицирующих факторов / В.Л. Шведов, А.А. Иванов, Н.Н. Клемпарская и др.; под ред. Ю.И. Москалева, В.С. Калистратовой. - М. : Минздрав РФ, Ин-т биофизики. - 1991. - С. 160-166.
65. Шиммель, Г. Методика электронной микроскопии / Г. Шиммель ; пер. с нем. - М. : Мир, 1972. - 300 с. : ил.
66. Abbas, M. Workplace influenza vaccination in two major industries in Saudi Arabia: a cost benefit analysis / M. Abbas, L. Fiala, L. Tawfiq // J Egypt Public Health Assoc. – 2006. – V. 81. – P. 59–73.
67. Allsopp, C.E. Comparison of numerous delivery systems for the induction of cytoxic T lymphocytes by immunization / C.E. Allsopp, M. Plebanski, S. Gilbert et al. // Eur J Immunol. – 1996. – V. 26. – P. 1951-1959.
68. Andrews, N. Age-specific effectiveness of an oil-in-water adjuvanted pandemic (H1N1) 2009 vaccine against confirmed infection in high risk groups in England / N. Andrews, P. Waight, C.F. Yung, E. Miller // J Infect Dis. – 2011. – V. 203. – P. 32–39.
69. Arnaud, P. The interferons: pharmacology, mechanism of action, tolerance and side effects / P. Arnaud // Rev. Med. Interne. – 2002. – V.23. – Suppl. 4. – P. 449s-458s.
70. Audibert, F.M. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects / F.M. Audibert, L.D. Lise // Immunol. Today. – 1993. – V. 14. – P. 281-284.

71. Baras, B. A vaccine manufacturer's approach to address medical needs related to seasonal and pandemic influenza viruses / B. Baras, N. Bouveret, J.M. Devaster et al. // Influenza Other Respi Viruses. – 2008. – V. 2(6). - P. 251-260.
72. Batista-Duharte, A. Immunological adjuvants. Determinant factors in the efficacy-toxicity ratio of the contemporary vaccines / A. Batista-Duharte, M. Lastre, O. Pérez // Enferm Infecc Microbiol Clin. - 2013. - pii: S0213-005X(12)00434-X.
73. Baz, M. H5N1 vaccines in humans / M. Baz, C.J. Luke, X. Cheng et al. // Virus Res. – 2013. - S0168-1702(13)00171-8.
74. Beyer, W. Comparison of serology and reactogenicity between influenza subunit vaccine and whole virus or split vaccine. A review and meta-analysis of the literature / W. Beyer, A. Palache, A. Osterhaus // Clin. Drug. Invest. - 1998. - V. 15. - P. 1-12.
75. Bhat-Schelbert, K. Barriers to and facilitators of child influenza vaccine - perspectives from parents, teens, marketing and healthcare professionals / K. Bhat-Schelbert, C.J. Lin, A. Matambanadzo et al. // Vaccine. – 2012. – V. 30(14). – P. 2448-2452.
76. Bodewes, R. Animal models for the preclinical evaluation of candidate influenza vaccines / R. Bodewes, G.F. Rimmelzwaan, A.D. Osterhaus // Expert Rev. Vaccines. - 2010. - V.9. - P. 59-72.
77. Cai, L. Cost-effectiveness analysis of influenza and pneumococcal vaccinations among elderly people in Japan / L. Cai, H. Uchiyama, S. Yanagisawa et al. // Kobe J. Med. Sci. - 2006. - V. 52. - P. 97-109.
78. Calabro, S. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes / S. Calabro, M. Tortoli, B.C. Baudner et al. // Vaccine. - 2011. - V. 29. - P. 1812-1823.
79. Carragher, D.M. A novel role for non-neutralizing antibodies against nucleoprotein in facilitating resistance to influenza virus / D.M. Carragher, D.A. Kaminski, A. Moquin et al. // J. Immunol. - 2008. - V. 181. - P. 4168-4176.
80. Carter, N.J. Prepandemic influenza vaccine H5N1 (split virion, inactivated, adjuvanted) [Prepandrix]: a review of its use as an active immunization against influenza A subtype H5N1 virus / N.J. Carter, G.L. Plosker // BioDrugs. – 2008. – V. 22(5). – P. 279-292.

81. CDC. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on immunization practices. – Ibid, 2010. – V. 59 (RR-8). – P. 1-62.
82. Cell, P.G.H. Clinical aspects of immunology / P.G.H. Cell, P.R.A. Coombs. – Edinburg : Oxford, 1975. – 1754 P.
83. Chaloupka, I. Comparative analysis of six European influenza vaccines / I. Chaloupka et al. // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 1996. – V. 15(2). – P. 121-127.
84. Chang, S. A novel vaccine adjuvant for recombinant flu antigens / S. Chang, J. Warner, L. Liang et al. // Biologicals. – 2009. – V. 37(3). – P. 141-147.
85. Chattaraj, S.C. Biodegradable microparticles of influenza viral vaccine: comparison of the effects of routes of administration on the in vivo immune response in mice / S.C. Chattaraj, A. Rathinavelu, S.K. Das // J Control Release. – 1999. – V. 58(2). – P. 223-232.
86. Clegg, C.H. Adjuvant solution for pandemic influenza vaccine production / C.H. Clegg, R. Roque, N. Van Hoeven et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2012. – V. 109(43). – P. 17 585-17 590.
87. Cotes, K. Clinical characteristics of patients hospitalized with severe respiratory illness during influenza seasons in the cities of Bogota and Manizales, Colombia 2000-2006 / K. Cotes, J. Moreno-Montoya, A. Porras-Ramírez et al. // Rev Salud Publica (Bogota). – 2012. – V. 14(1). – P. 129-142.
88. Cox, J.C. Adjuvants - a classification and review of their modes of action / J.C. Cox, A.R. Coulter // Vaccine. - 1997. - V. 15. - № 3. - P. 248-256.
89. Cox, R.J. Evaluation of a virosomal H5N1 vaccine formulated with Matrix M™ adjuvant in a phase I clinical trial / R.J. Cox, G. Pedersen, A.S. Madhun et al. // Vaccine. – 2011. – V. 29(45). – P. 8049-8059.
90. Cunningham, A.F. Pinpointing IL-4 independent acquisition and IL-4-influenced maintenance of Th2 activity by CD4 T cells / A.F. Cunningham, K. Serre, K.M. Toellner et al. // Eur. J. Immunol. – 2004. – V. 34. - № 3. – P. 686-694.
91. D'Heilly, S.J. Work-site–based influenza vaccination in healthcare and non–healthcare settings / S.J. D'Heilly, K.L. Nichol // Infect Control Hosp Epidemiol. – 2004. – V. 25. – P. 941–945.
92. Davenport, F. Lack of adjuvant effect of AlPO4 on purified influenza haenagglutinin in man / F. Davenport, A. Hennessy, F. Askin // J. Immunol. – 1968. – V. 100. – P. 1139-1140.
93. Degano, P. Gene gun intradermal DNA immunization followed by boosting with modified vaccinia virus Ankara: enhanced CD8+ T cell immunogenicity

and protective efficacy in the influenza and malaria models / P. Degano, J. Schneider, C.M. Hannan et al. // Vaccine. - 1999. - V. 18. - 623-632.

94. Denis, J. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform / J. Denis, E. Acosta-Ramirez, Y. Zhao et al. // Vaccine. – 2008. – V. 26(27-28). – P .3395-3403.
95. Denis, J. Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization / J. Denis, N. Majeau, E. Acosta-Ramirez et al. // Virology. – 2007. – V. 363(1). – P. 59-68.
96. Dille, J.H. A worksite influenza immunization program. Impact on lost work days, health care utilization, and health care spending / J.H. Dille // AAOHN J. – 1999. – V. 47. – P. 301–309.
97. Dip, R.M. Influenza vaccination in non-institutionalized elderly: a population-based study in a medium-sized city in Southern Brazil / R.M. Dip, M.A. Cabrera // Cad Saude Publica. – 2010. – V. 26(5). - P. 1035-1044.
98. Dorrington, M.G. Immunosenescence and Novel Vaccination Strategies for the Elderly/ M.G. Dorrington, D.M.E. Bowdish // Front Immunol. – 2013. – V. 4. – P. 171.
99. Ducatez, M.F. Long-term vaccine-induced heterologous protection against H5N1 influenza viruses in the ferret model / M.F. Ducatez, A. Webb, J.C. Crumpton et al. // Influenza Other Respi Viruses. – 2013. – V. 7(4). – P. 506-512.
100. Ellebedy, A.H. Inflammasome-independent role of the apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) in the adjuvant effect of MF59 / A.H. Ellebedy, C. Lupfer, H.E. Ghoneim et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2011. – V. 108(7). – P. 2927-2932.
101. Even-Or, O. Adjuvanted influenza vaccines / O. Even-Or, S. Samira, R. Ellis et al. // Expert Reviw of vaccines. – 2013. – V. 12(9). – P. 1095-1108.
102. Fang, Y. Molecular characterization of in vivo adjuvant activity in ferrets vaccinated against influenza virus / Y. Fang, T. Rowe, A.J. Leon et al. // J Virol. – 2010. – V. 84(17). – P. 8369-8388.
103. Fiore, A.E. Seasonal influenza vaccines / A.E. Fiore, C.B. Bridges, N.J. Cox // Curr. Top. Microbiol. Immunol. - 2009. - V. 333. - P. 43-82.
104. Fraser, C.K. Improving vaccines by incorporating immunological coadjuvants / C.K. Fraser, K.R. Diener, M.P. Brown et al. // Expert Reviw of vaccines. – 2007. – V. 6(4). – P. 559-578.

105. Galli, G. Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4+ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels / G. Galli, D. Medini, E. Borgogni et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2009. - V. 106. - P. 3877-3882.

106. Gamvrellis, A. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells / A. Gamvrellis, D. Leong, J.C. Hanley et al. // Immunol. Cell. Biol. – 2004. – V. 82. – P. 506-516.

107. Garten, R.J. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans / R.J. Garten et al. // Science. - 2009. - V. 325. - P. 197-201.

108. Gasparini, R. Aflunov®: a prepandemic influenza vaccine / R. Gasparini, D. Amicizia, P.L. Lai et al. // Expert Rev Vaccines. – 2012. – V. 11(2). – P. 145-157.

109. Gendon, I.Z. Increasing the immunogenicity of inactivated chitosan adjuvanted vaccine from A/California/7/09 (H1N1) strain and analyzing the antigenic specificity of this influenza virus strain / I.Z. Gendon, S.G. Markushin, I.M. Vasil'ev et al. // Vopr Virusol. – 2012. – V. 57(1). – P. 28-33.

110. Glenny, A.T. Active Immunity to Diphtheria in the Absence of Detectable Antitoxin / A.T. Glenny, K. Allen // J Hyg (Lond). – 1922. – V. 21 (1). – P. 100 – 103.

111. Glenny, A.T. Notes on the Production of Immunity to Diphtheria Toxin / A.T. Glenny, H.J. Südmersen // J Hyg (Lond). – 1921. - V. 20 (2). – P. 176-220.

112. Glica, V. Antibody persistence and response to 2010-2011 trivalent influenza vaccine one year after a single dose of 2009 AS03-adjuvanted pandemic H1N1 vaccine in children / V. Glica, G. De Serres, M.E. Hamelin et al. // Vaccine. – 2011. – V. 30(1). – P. 35-41.

113. Gregoriades, A. Isolation of neuraminidase from the WSN strain of influenza virus / A. Gregoriades // Virology. – 1972. – V. 49(1). – P. 333-336.

114. Gupta, R.K. Adjuvants for human vaccines – current status, problems and future prospects / R.K. Gupta, G.R. Siber // Vaccine. – 1995. – V 13 (14). – P. 1263-1276.

115. Håberg, S.E. Risk of fetal death after pandemic influenza virus infection or vaccination / S.E. Håberg, L. Trogstad, N. Gunnes et al. // N Engl J Med. – 2013. – V. 368(4). – P. 333-340.

116. Haensler, J. Introduction to novel vaccine adjuvants and their role in influenza vaccination / J. Haensler // Ann Pharm Fr. – 2013. – V. 71(2). – P. 104-108.
117. Hancock, K. Cross-Reactive Antibody Response to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus / K. Hancock, V.M.P.H. Veguilla, X.M.D. Lu et al. // N Engl J Med. - 2009. - V. 361. - P. 1945-1952.
118. Hannoun, C., Megas, F., Piercy, J. Immunogenicity and protective efficacy of influenza vaccination / C. Hannoun, F. Megas, J. Piercy // Virus Research. – 2004. – V. 103. – P. 133-138.
119. Haslam, E.A. The polypeptides of influenza virus. 3. Identification of the hemagglutinin, neuraminidase and nucleocapsid proteins / E.A. Haslam et al. // Virology. – 1970. – V. 42(3). – P. 566-575.
120. Hatz, C.A randomised, single-blind, dose-range study to assess the immunogenicity and safety of a cell-culture-derived A/H1N1 influenza vaccine in adult and elderly populations / C. Hatz, J.P. Cramer, A. Vertruyen et al. // Vaccine. – 2012. – V. 30(32). – P. 4820-4827.
121. http://www.allergytherapeutics.com/uploads/12147mpldec08151208.pdf
122. Hwang, S.M. Comparison of the adverse events associated with MF59-adjuvanted and non-adjuvanted H1N1 vaccines in healthy young male Korean soldiers / S.M. Hwang, H.L. Kim, K.W. Min et al. // Jpn J Infect Dis. – 2012. – V. 65(3). – P. 193-197.
123. Iannazzo, S. Pharmacoeconomic evaluation of the MF59--adjuvanted influenza vaccine in the elderly population in Italy / S. Iannazzo // J. Prev. Med. Hyg. - 2011. - V. 52. - P. 1-8.
124. Iorio, A.M. Influenza viruses and cross-reactivity in healthy adults: humoral and cellular immunity induced by seasonal 2007/2008 influenza vaccination against vaccine antigens and 2009 A(H1N1) pandemic influenza virus / A.M. Iorio, O. Bistoni, M. Galdiero et al. // Vaccine. – 2012. – V. 30(9). – P. 1617-1623.
125. Ito, T. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins / T. Ito, T.O. Gorman, Y. Kawaoka et al. // J. Virol. - 1991. - V. 65. - P. 5491-5498.
126. Jefferson, T. Vaccines for preventing influenza in healthy children / T. Jefferson, A. Rivetti, C. Di Pietrantonj et al. // Cochrane Database Syst Rev. – 2012. – V. 8. - CD004879.
127. Kajaste-Rudnitski, A. Induction of protective antibody response by MF59-adjuvanted 2009 pandemic A/H1N1v influenza vaccine in HIV-1-

infected individuals / A. Kajaste-Rudnitski, L. Galli, S. Nozza et al. // AIDS. – 2011. – V 25(2). – P. 177-183.

128. Kelly, D. Responses to pandemic ASO3-adjuvanted A/California/07/09 H1N1 influenza vaccine in human immunodeficiency virus-infected individuals / D. Kelly, K. Brut, B. Missaghi et al. // BMC Immunol. – 2012. – V. 13. - PMC3482569.

129. Khurana, S. MF59 adjuvant enhances diversity and affinity of antibody-mediated immune response to pandemic influenza vaccines / S. Khurana, N. Verma, J.W. Yewdell et al. // Sci. Transl. Med. - 2011. - V. 3. (85). - 85ra48.

130. Khurana, S. Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus / S. Khurana, Chearwae W., Castellino F. et al. // Sci. Transl. Med. - 2010. - V. 2. (15). - 15ra5.

131. Kim, S. Mitochondrial reactive oxygen species modulate innate immune response to influenza A virus in human nasal epithelium / S. Kim, M.J. Kim, D.Y. Park et al. // Antiviral Res. – 2015. – V. 119. – P. 78-83.

132. Klenk, H.D. On the structure of the influenza virus envelope / H.D. Klenk et al. // Virology. – 1972. – V. 47(3). – P. 579-591.

133. Kreijtz, J.H. Preclinical evaluation of a modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vaccine against influenza A/H5N1 viruses / J.H. Kreijtz, Y. Suezer, G. De Mutsert et al. // Vaccine. - 2009. - V. 27. - 6296-6299.

134. Kreijtz, J.H. Cross-Recognition of Avian H5N1 Influenza Virus by Human Cytotoxic T-Lymphocyte Populations Directed to Human Influenza A Virus / J.H. Kreijtz, G. De Mutsert, C.A. Van Baalen et al. // J Virol. – 2008. – V. 82(11). – P. 5161–5166.

135. Kulkarni, R.R. Activation of the RIG-I pathway during influenza vaccination enhances the germinal center reaction, promotes T follicular helper cell induction, and provides a dose-sparing effect and protective immunity / R.R. Kulkarni, M.A. Rasheed, S.K. Bhaumik et al. // J Virol. – 2014. – V. 88(24). – P. 13990-14001.

136. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 685-689.

137. Lazarowitz, S.G. Proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide of influenza virus. Function of the uncleaved polypeptide HA / S.G. Lazarowitz et al. // Virology. – 1973. – V. 52(1). – P. 199-212.

138. Lazarowitz, S.G. Influenza virus structural and nonstructural proteins in infected cells and their plasma membranes / S.G. Lazarowitz et al. // Virology. – 1971. – V. 46(3). – P. 830-843.

139. Lazdins, I. The polypeptides of influenza virus. VI. Composition of the neuraminidase / I. Lazdins et al. // Virology. – 1972. – V. 49(3). – P. 758-765.

140. Liu, Y.H. Reduction of acute respiratory illness (ARI) due to a voluntary workplace influenza vaccination program: who are more likely to get the benefit / Y.H. Liu, L.M. Huang, J.D. Wang // J Occup Health. – 2004. – V. 46. - P. 455-460.

141. MacDonald, A.S. CD8-dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development / A.S. MacDonald, A.D. Straw, B. Bauman, E.J. Pearce // J. Immunol. – 2001. – V. 167. – P. 1982.

142. Mahamat, A. Additive preventive effect of influenza and pneumococcal vaccines in the elderly: Results of a large cohort study / A. Mahamat, J. P. Daurès, B. De Wzieres // Hum Vaccin Immunother. – 2013. – V. 9(1). – P. 128-135.

143. Maher, J.A. The ferret: an animal model to study influenza virus / J.A. Maher, J. DeStefano // Lab Anim (NY). – 2004. – V. 33(9). – P. 50-53.

144. Marchisio, P. Efficacy of inactivated virosomal adjuvanted influenza vaccine in preventing Acute Otitis Media in children with a history of complicated or uncomplicated recurrent Acute Otitis Media / P. Marchisio, M. Fusi, R. Picchi et al. // The Third European influenza conference. – 2008. – P. 229.

145. Mark, A. Immunoglobulin IgE response to diphteria and tetanus toxoid after booster with aluminium-absorbed and fluid DT- vaccine / A. Mark, B. Bjorksten, M. Granstrom // Vaccine. - 1995. - V. 13. - P. 669-673.

146. Martin, J. T. Development of an adjuvant to enhance the immune response to influenza vaccine in the elderly / J. T. Martin // Biologicals. – 1997. – V. 25(2). – P. 209-213.

147. Mereckiene, J. National seasonal influenza vaccination survey in Europe, 2008 / J. Mereckiene, S. Cotter, A. Nicoll et al. // Euro Surveill. – 2008. - V. 13(43). – 43 p.

148. Miller, E. Risk of narcolepsy in children and young people receiving AS03 adjuvanted pandemic A/H1N1 2009 influenza vaccine: retrospective analysis / E. Miller, Andrews N., Stellitano L. et al. // BMJ. – 2013. – 346. - f794. doi: 10.1136/bmj.f794.

149. Mixeu, M.A. Impact of influenza vaccination on civilian aircrew illness and absenteeism / M.A. Mixeu, G.N. Vespa, E. Forleo-Neto et al. // Aviat SpaceEnviron Med. – 2002. - V. 73. – P. 876–880.

150. Montastruc, J.L. Pandemrix, (H1N1)v influenza and reported case of narcolepsy / J.L. Montastruc, G. Durrieu, O. Rascol // Vaccine. - 2011. - V. 29(11). - doi: 10.1016/j.

151. Monto, A.S. Comparative efficacy of inactivated and live attenuated influenza vaccines / A.S. Monto, S.E. Ohmit, J.G. Petrie et al. // N Engl J Med. – 2009. – V. 361. – P. 1260-1267.

152. Morales, A. Costs and benefits of influenza vaccination and work productivity in a Colombian company from the employer's perspective / A. Morales, M.M. Martinez, A. Tasset-Tisseau et al. // Value Health. – 2004. – V. 7. – P. 433–441.

153. Morel, S. Adjuvant System AS03 containing α-tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity / S. Morel, A. Didierlaurent, P. Bourguignon et al. // Vaccine. – 2011. – V. 29(13). – P. 2461-2473.

154. Mottram, P.L. Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: Formulation of a model vaccine for respiration syncytial virus / P.L. Mottram, D. Leong, B. Crimeen-Irwin et al. // Mol. Pharm. – 2007. – V. 4. - № 1. – P. 73-84.

155. Nagel, J.E. IgE synthesis in man, II: comparison of tetanus and difteria IgE antibody in allergic and nonallergic children / J.E. Nagel, C. White, M.S. Lin // J. Allergy Clin. Immunol. - 1979. - V. 63. - P. 308-314.

156. Nichol, K.L. Efficacy and effectiveness of influenza vaccination / K. L. Nichol // Vaccine. - 2008. - V. 26. – D. 17-22.

157. Nichol, K.L. Vaccines for seasonal and pandemic influenza / K.L. Nichol, J.J. Treanor // J Infect Dis. – 2006. – V. 194 (Suppl 2). – P. S111-118.

158. Nichol, K.L. The effectiveness of vaccination against influenza in healthy, working adults / K.L. Nichol, A. Lind, K.L. Margolis et al. // N Engl J Med. – 1995. – V. 333. – P. 889–893.

159. O'Hagan, D.T. MF59 adjuvant: the best insurance against influenza strain diversity / D.T. O'Hagan, R. Rappuoli, E. De Gregorio et al. // Expert Rev. Vaccines. - 2011. - V. 10. - P. 447-462.

160. O'Reilly, F.W. Sickness absence due to influenza / F.W. O'Reilly, A. B. Stevens // Occup Med (Lond). – 2002. – V. 52. - P. 265–269.

161. Ohmit, S.E. Prevention of antigenically drifted influenza by inactivated and live attenuated vaccines / S.E. Ohmit, J.C. Victor, J.R. Rotthoff et al. // N Engl J Med. – 2006. – V. 355. – P. 2513-2522.
162. Olsen, G.W. Worksite influenza immunization programs. Insight into the implementation and cost-benefit / G.W. Olsen, M.E. Steinberg, C.A. Ley // AAOHN J. – 2005. – V. 53. – P. 105–110.
163. Osterhaus, A. Towards universal influenza vaccines? / A. Osterhaus, R. Fouchier, G. Rimmelzwaan // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2011. – V. 366(1579). – P. 2766-2773.
164. Palache, A.M. Immunogenicity and reactogenicity of influenza subunit vaccines produced in MDCK cells or fertilized chicken eggs / A.M. Palache , R. Brands, G. J. Van Scharrenburg // Journal of Infectious Diseases. – 1997. – V. 176 (Suppl. 1). – P. S20-S23.
165. Parodi, V. Inactivated influenza vaccines: recent progress and implications for the elderly / V. Parodi, D. De Florentiis, M. Martini et al. // Drugs Aging. – 2011. – V. 28(2). – P. 93-106.
166. Pearse, M. J. ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery / M.J. Pearse, D. Drane // Adv Drug Deliv Rev. – 2005. – V. 57(3). – P. 465-474.
167. Petrovsky, N. Vaccine adjuvants: current state and future trends / N. Petrovsky, J.C. Aguilar // Immunol Cell Biol. – 2004. – V. 82(5). – P. 488-496.
168. Petukhova, G. B- and T-cell memory elicited by a seasonal live attenuated reassortant influenza vaccine: assessment of local antibody avidity and virus-specific memory T-cells using trogocytosis-based method / G. Petukhova, D. Korenkov, T. Chirkova et al. // Influenza Other Respi Viruses. – 2012. – V. 6(2). – P. 119-126.
169. Plotkin, J.B. Codon bias and frequency-dependent selection on the hemagglutinin epitopes of influenza A virus / J.B. Plotkin, J. Dushoff // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – V. 100(12). – P. 7152–7157.
170. Potter, C. Inactivated influenza virus vaccine : Basic and Applied. Influenza / C. Potter; Ed. A. Bear. - Florida : Boca Ration, 1982. – P. 116-158.
171. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) : Morbidity and Mortality / Weekly Report. - № RR-6 - V. 56. - 2007. – 60 p.
172. Ramon, G. Sur la toxine or surranatoxine diphtheriques / G. Ramon // Ann. Inst. Pasteur. – 1924. – V. 38. – P. 1-7.

173. Rappuoli, R. Influenza Vaccines for the Future / Rappuoli R. & Del Giudice G. - 2nd Edition. – Berlin : Springer, 2012 - p. 446. – ISBN 978-3-0346-0278-5.

174. Reimer, J.M., Karlsson, K.H., Lövgren-Bengtsson, K. et al. Matrix M™ adjuvant induces local recruitment, activation and maturation of central immune cells in absence of antigen / J.M. Reimer, K.H. Karlsson, K. Lövgren-Bengtsson et al. // PLOS one. – 2012. – DOI: 10.1371/journal.pone.0041451.

175. Rothberg, M.B. Complications of seasonal and pandemic influenza / M.B. Rothberg, S.D. Haessler // Crit Care Med. – 2010. – V. 38(4 Suppl). – P. e91-97.

176. Ruben, O.D. Prospecting the influenza hemagglutinin to develop universal vaccines / O.D. Ruben, N.J. Cox // Clin Infect Dis. – 2011. – V. 52(8). – P. 1010-1012.

177. Rubinstein, F. Influenza A/H1N1 MF59 adjuvanted vaccine in pregnant women and adverse perinatal outcomes: multicentre study / F. Rubinstein, P. Micone, A. Bonotti et al. // BMJ. – 2013. – V. 346. – P. f393.

178. Russell, C.A. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses / C.A. Russell, T.C. Jones, I.G. Barr et al. // Vaccine. - 2008. - V. 26(Suppl.4). - D31-D34.

179. Russell, C.A. The global circulation of seasonal influenza A(H3N2) viruses / C.A. Russell, T.C. Jones, I.G. Barr et al. // Science. - 2008. - V. 320. - P. 340-346.

180. Sagawa, M. Immune response to influenza vaccine in the elderly: association with nutritional and physical status / M. Sagawa, N. Kojimahara, N. Otsuka et al. // Geriatr Gerontol Int. – 2011. – V. 11(1). – P. 63-68.

181. Samad, A.H. Workplace vaccination against influenza in Malaysia: does the employer benefit? / A.H. Samad, M.H. Usul, D. Zakaria et al. // J Occup Health. – 2006. – V. 48. – P. 1–10.

182. Savard, C. Improvement of the trivalent Inactivated flu vaccine using PapMV nanoparticles / C. Savard, A. Guerin, K. Droin et al. // PLoS One. – 2011. – V. 6(6). - e21522.

183. Scheifele, D.W. Evaluation of adjuvanted pandemic H1N1(2009) influenza vaccine after one and two doses in young children / D.W. Scheifele, B.J. Ward, M. Dionne et al. // Pediatr Infect Dis J. – 2011. – V. 30(5). – P. 402-407.

184. Schultze, V. Safety of MF59 adjuvant / V. Schultze, V. D'Agosto, A. Wack et al. // Vaccine. – 2008. – V. 26(26). – P. 3209-3222.

185. Settembre, E.C. Learning from the 2009 H1N1 pandemic: prospects for more broadly effective influenza vaccines / E.C. Settembre, P.R. Dormitzer, R. Rappuoli // J Mol Cell Biol. – 2011. – V. 3(3). – P. 144-146.

186. Seubert, A. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells / A. Seubert, E. Monaci, M. Pizza et al. // J. Immunol. - 2008. - V. 180. - P. 5402-5412.

187. Skea, D.L. Adhesion-mediated enhancement of the adjuvant activity of alum / D.L. Skea, B.H. Barber // Vaccine. – 1993. – V. 11(10). – P. 1018-1026.

188. Skehel, J.J., Schild, G.C. / The polypeptide composition of influenza A viruses // J.J. Skehel, G.C. Schild. - Virology. – 1971. – V. 44(2). – P. 396-408.

189. Smith, D.J. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus / D.J. Smith, A.S. Lapedes, J.C. De Jong et al. // Science. - 2004. - V. 305. - P. 371-376.

190. Smith, L.R., Wodal W., Crowe B.A. et al. Preclinical evaluation of Vaxfectin®-adjuvanted Vero cell-derivated seasonal aplit and pandemic whole virus influenza vaccines / L.R. Smith, W. Wodal, B.A. Crowe et al. // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2013. – V. 9(6). – P. 1333-1345.

191. Stanley, P. The polypeptides of influenza virus. 8. Large-scale purification of the hemagglutinin // P. Stanley et al. - Virology. – 1973. – V. 56(2). – P. 640-645.

192. Stark, G.V. Clinical profiles associated with influenza disease in the ferret model / G.V. Stark, J.P. Long, D.I. Ortiz et al. // PLoS One. – 2013. – V. 8(3). - e58337.

193. Steel, J. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain / J. Steel, A.C. Lowen, T.T. Wang et al. // Mbio. - 2010. - V. 1. - e00018.

194. Stewart-Tull, D.E.S. Harmful and beneficial activities of immunological adjuvants / D. E. S. Stewart-Tull // Methods in Molecular Medicine: Vaccine Adjuvants : Preparation Methods and Research Protocols / ed. Totowa N.J., O'Hagan D.T. - Humana Press, 2000. – P. 29–48.

195. Stowe, J. Risk of convulsions in children after monovalent H1N1 (2009) and trivalent influenza vaccines: a database study / J. Stowe, N. Andrews, P. Bryan et al. // Vaccine. – 2011. – 29(51). – P. 9467-9472.

196. Strunk, C. Innovative workplace influenza program: boosting employee immunization rates / C. Strunk // AAOHN J. – 2005. - V. 53. – P. 432–437.

197. Sui, J. Wide prevalence of heterosubtypic broadly neutralizing human anti-influenza A antibodies / J. Sui, J. Sheehan, W.C. Hwang et al. // Clin Infect Dis. – 2011. – V. 52(8). – P. 1003-1009.

198. Sullivan, S.M. Vaxfectin: a versatile adjuvant for plasmid DNA- and protein-based vaccines / S.M. Sullivan, J. Doukas, J. Hartikka et al. // Expert Opin Drug Deliv. – 2010. – V. 7(12). – P. 1433-1446.

199. Szymczakiewicz-Multanowska, A. Safety assessment and immunogenicity of a cell-culture-derived influenza vaccine in adults and elderly subjects over three successive influenza seasons / A. Szymczakiewicz-Multanowska , M. Lattanzi, A. Izu, et al. // Hum Vaccin Immunother. – 2012. – V. 8(5). – P. 645-652.

200. Trinchieri, G. Interleukin 12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity / G. Trinchieri // Nat. Rev. Immunol. – 2003. – V. 3. – P. 133.

201. Tsai, T.F. Fluad®-MF59®-Adjuvanted influenza vaccine in older adults / T.F. Tsai // J. Infect. Chemother. – 2013. – 45(2). – P. 159-174.

202. Vabret, A. Seasonal flu / A. Vabret, J. Dina, D. Cuvillon-Nimal et al. // Pathol. Biol. – 2010. – V. 58(2). - P. e51-57.

203. Vesikari, T. Enhanced immunogenicity of seasonal influenza vaccines in young children using MF59 adjuvant / T. Vesikari, M. Pellegrini, A. Karvonen et al. // Pediatr Infect Dis J. – 2009. – V. 28(7). – P. 563-571.

204. Vesikari, T. MF59-adjuvanted influenza vaccine (FLUAD) in children: safety and immunogenicity following a second year seasonal vaccination / T. Vesikari, N. Groth, A. Karvonen et al. // Vaccine. – 2009. – V. 27(45). – P. 6291-6295.

205. Vynnycky, E. Estimating the impact of childhood influenza vaccination programmes in England and Wales / E. Vynnycky, R. Pitman, R. Siddiqui et al. // Vaccine. – 2008. – V. 26(41). – P. 5321-5330.

206. Wang, T.T. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes / T.T. Wang et al. // Proc. Natl Acaad. Sci. USA. - 2010. - V. 107. - P. 18 979 - 18 984.

207. Weaver, E.A. Protection against Divergent Influenza H1N1 Virus by a Centralized Influenza Hemagglutinin / E.A. Weaver, A.M. Rubrum, R.J. Webby // PLoS One. – 2011. – V. 6(3). - e18314.

208. Wegmann, F. Polyethyleneimine is a potent mucosal adjuvant for viral glycoprotein antigens / F. Wegmann, K.H. Gartlan, A.M. Harandi et al. // Nat Biotechnol. – 2012. – V. 30(9). – P. 883-888.

209. Wei, C.J. Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination / C.J. Wei et al. // Science. - 2010. - V. 329. - P. 1060-1064.
210. WHO. Influenza vaccines : WHO Position Paper / Weekly Epidemiological Record. - № 33. – V. 8. – 2005. - P. 277-288.
211. Williams, W.W. Influenza vaccination coverage among adults : National Health Interview Survey, United States, 2008-09 influenza season / W.W. Williams, P.J. Lu, M.C. Lindley et al. // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. – 2012. – V. 61 (Suppl). – P. 65-72.
212. Windon, R.G. Local immune responses to influenza antigen are synergistically enhanced by the adjuvant ISCOMATRIX / R.G. Windon, P.J. Chaplin, P. McWaters et al. // Vaccine. – 2001. – V. 20(3-4). – P. 490-497.
213. Wood, J.M. New challenges for influenza vaccine development / J.M. Wood // The Third European influenza conference. - 2008. - P. 225.
214. Wood, J.M. Selection of influenza vaccine strains and developing pandemic vaccines / J.M. Wood // Vaccine. - 2002. - V. 20 (Suppl . 5). – P. B40-B44.
215. Yasugi, M. Human Monoclonal Antibodies Broadly Neutralizing against Influenza B Virus / M. Yasugi, R. Kubota-Koketsu, A. Yamashita, et al. // PLoS Pathog. – 2013. – V. 9(2). - e1003150.
216. Yu, S. Novel Th1-biased adjuvant, SP01, enhances mucosal and systemic immunogenicity of vaccines administered intranasally in mice / S. Yu , C. Tang, X. Shi et al. // Vaccine. - 2012. - V. 30(36). – P. 5425-5436.
217. Zarocostas, J. WHO backs further probes into possible link between H1N1 and narcolepsy in children / J. Zarocostas // Br. Med. J. - 2011. -V. 342. - d909.
218. Zhang, Y. Simultaneous detection of oseltamivir- and amantadine-resistant influenza by oligonucleotide microarray visualization / Y. Zhang, Q. Liu, D. Wang et al. // PLoS One. – 2013. – V. 8(2). – e57154.
219. Zhang, S. Virus-like particle vaccine activates conventional B2 cells and promotes B cell differentiation to IgG2a producing plasma cells / S. Zhang, R. Cubas, M. Li et al. // Mol Immunol. – 2009. – V. 46(10). – P. 1988-2001.
220. Zuccotti, G. Transplacental antibody transfer following maternal immunization with a pandemic 2009 influenza A(H1N1) MF59-adjuvanted vaccine / G. Zuccotti, L. Pogliani, E. Pariani et al. // JAMA. – 2010. – V. 304(21). – P. 2360-2361.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Перечень рисунков:

Перечень таблиц: