

**Филатов Илья Евгеньевич**

**ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ, ИММУНОГЕННОСТИ И ПРОТЕКТИВНОСТИ  
ВАКЦИНЫ «ГАМ-VLP-РОТА» ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ  
НА РЕЛЕВАНТНОЙ МОДЕЛИ ЖИВОТНЫХ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук**

**Москва - 2025**

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

**Научный руководитель:**

**Гребенникова Татьяна Владимировна** – член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе Института вирусологии им Д.И. Ивановского, руководитель лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»

**Официальные оппоненты:**

**Сяткин Сергей Павлович** - доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры общей патологии и патологической физиологии им. В.А. Фролова, медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

**Сомов Дмитрий Владимирович** – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры промышленной фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, вр.и.о. генерального директора ФГБУ «Информационно-методический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения» Росздравнадзора.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.021 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Электронная версия диссертации, автореферат и объявление о защите размещены на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки РФ (<http://vak.ed.gov.ru/>) и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г.

**Учёный секретарь**

**диссертационного совета ПДС 0300.021**

**Кандидат химических наук, доцент**

**Левицкая Ольга Валерьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Среди иммунобиологических лекарственных средств вакцины на основе вирусоподобных частиц (Virus-like particles, VLP), отличаются благоприятным профилем безопасности (Zeltins, 2013). VLP имеют олигомерную структуру из многих отдельных полипептидов, складывающихся в частицу с размерами более 50 нм и не содержат нуклеиновых кислот (Crawford, 1994). VLP имитируют структуру живого вируса и, следовательно, имеют характерные эпитопы (Changotra, 2017). В мировой практике созданы и внедрены вакцины для профилактики гриппа А (Mena, 1996), гепатита В (Mahmood, 2023), папилломавирусной инфекции (Harper, 2004). Одним из перспективных направлений в фармации является создание иммунобиологического лекарственного средства на основе VLP для профилактики ротавирусной инфекции. Исходя из данных Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) клинические проявления ротавирусной инфекции, а именно, острый гастроэнтерит, сопровождающийся тяжелой диареей и ведущий к тяжелой дегидратации организма, является одной из ведущих причин смертности детей до 5 лет (Troeger, 2018). Специфического лечения нет, поэтому наиболее эффективным методом борьбы с ротавирусной инфекцией (РВИ) является вакцинопрофилактика. В России для иммунизации всегда применялись только импортные вакцины, такие как Рота-V-Эйд (Serum Institute of India, Индия), Ротатек (Merck sharp&Dohme, LLC, США), Ротарикс (GlaxoSmithKline Biologicals, s.a., Бельгия). Все вакцины для профилактики ротавирусных гастроэнтеритов – живые, поэтому могут приводить к тяжелому осложнению – инвагинации кишечника (Yen, 2016).

Ранее была разработана экспериментальный прототип вакцины на основе вирусоподобных частиц для профилактики ротавирусной инфекции (Черепушкин, 2021). Представленное исследование направлено на доклиническое изучение безопасности, иммуногенности и протективности вакцины на основе вирусоподобных частиц «Гам-VLP-рота на релевантной модели новорожденных карликовых свиней и разработку чувствительного и специфичного метода определения антител различных классов к РВИ.

**Степень разработанности темы исследования.** Разработан новый отечественный иммунобиологический лекарственный препарат – вакцина Гам-VLP-рота на основе инновационной платформы для профилактики ротавирусной инфекции. Антиген вакцины представляет собой смесь трехслойных вирусоподобных частиц, имитирующих вирион ротавируса. При этом поверхностные антигены представлены 6-ю актуальными генотипами, циркулирующими на территории Российской Федерации. В представленном исследовании разработаны и стандартизированы методы контроля готовой формы вакцины и оценена безопасность и иммуногенность, а также протективные свойства препарата на релевантной животной модели.

**Объект исследования.** В рамках диссертационной работы объектом исследования являлась вакцина «Гам-VLP-Рота» для профилактики ротавирусной инфекции.

**Предмет исследования.** Разработка и валидация методик оценки свойств вакцинного препарата.

**Цель исследования:** Оптимизация и стандартизация методов контроля безопасности, иммуногенности, протективности вакцины «Гам-VLP-рота» для профилактики ротавирусной инфекции на основе VLP.

**Задачи исследования:**

1. Разработать специфичную и чувствительную тест-систему на основе иммуноферментного анализа для определения антител к ротавирусу А у различных животных.
2. Разработать и валидировать методику контроля вакцины «Гам-VLP-рота» по показателю «Специфическая активность» при его производстве на модели морских свинок.
3. Исследовать безопасность вакцинного препарата «Гам-VLP-рота» по динамике изменения массы и температуры тела, а также исследованию биохимических и гематологических показателей крови карликовых свиней при трехкратной вакцинации.
4. Оценить иммуногенные свойства вакцины «Гам-VLP-рота» при ее трёхкратном введении новорожденным карликовым свиньям.
5. Оценить протективность вакцины «Гам-VLP-рота» при ее трёхкратном введении новорожденным карликовым свиньям.

**Научная новизна.** *Впервые* в нашей стране получен и охарактеризован препарат двуслойных вирусоподобных частиц, состоящих из рекомбинантных белков VP2 и VP6 ротавируса А человека. *Впервые* на его основе разработана иммуноферментная тест-система, предназначенная для оценки иммунного ответа у различных видов животных, отличающаяся высокими валидационными параметрами.

Научно обоснованы и экспериментально подтверждены подходы к выбору лабораторных моделей и методов исследований при конструировании и оценке эффективности вакцинных препаратов против ротавирусных инфекций человека и животных.

Доказано, что разработанная тест-система на основе ИФА может использоваться в качестве внутреннего и внешнего контроля при серийном производстве вакцины «Гам-VLP-рота».

В опыте на карликовых свиньях установлена высокая иммунобиологическая эффективность вакцины «Гам-VLP-рота» и показано, что трёхкратная иммунизация в дозах 30 и 120 мкг вызывает формирование противовирусного иммунитета у животных.

Показана хорошая переносимость вводимого препарата во всём диапазоне доз. Впервые показано, что трехкратная иммунизация вакциной «Гам-VLP-рота» в дозировках 30 мкг, 120

мкг и 600 мкг не вызывает неблагоприятных эффектов и не влияет на клинические и биохимические гематологические показатели крови подопытных животных.

Научная новизна работы и отдельных методических подходов подтверждены: Патентом РФ на изобретение «Вирусоподобные химерные частицы для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого респираторного синдрома Sars-Cov-2, содержащие белки коронавируса и ротавируса» № RU 2779810 C1 и Патентом РФ на изобретение «Иммунобиологическое средство на основе вирусоподобных частиц для индукции специфического иммунитета против инфекции, вызываемой ротавирусом А человека» № RU 2795055, в которых нашли отражение результаты проведенных исследований.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Теоретическая значимость работы заключается в апробации современных подходов к конструированию рекомбинантных антигенов ротавирусов и научно-практическом обосновании использования подходов фармацевтической химии, а также иммунологических, биохимических и гематологических показателей в опытах по определению иммуногенности вакцины «Гам-VLP-рота». Сформулировано предложение по использованию комплекса разноплановых лабораторных методов исследований, характеризующих гуморальный и клеточный иммунный ответ к ротавирусу А человека у мышей, морских свинок и карликовых свиней.

Практическая значимость работы состоит в том, что материалы диссертации вошли в нормативно-техническую документацию на государственную регистрацию и производство вакцины «Гам-VLP-рота». Вакцина для профилактики ротавирусной инфекции человека, вызванной ротавирусом типа А», а также в отчеты по доклиническим исследованиям вакцинного препарата. В настоящее время вакцина «Гам-VLP-рота» проходит 2/3 фазы клинического исследования на детях разных возрастов.

**Методология и методы исследования.** Для проведения исследования иммуногенности и безопасности вакцины на основе VLP для профилактики ротавирусной инфекции с использованием релевантной модели животных предусмотрен комплексный методический подход, включающий: разработку и валидацию методик контроля вакцинного препарата, подготовку животных к опытам; оценку базовых показателей, включая гематологический и биохимический анализ; планирование экспериментов; вакцинацию и контроль за процессом; мониторинг иммунного ответа; исследование противовирусной защиты; статистическая обработка полученных данных для оценки степени иммуногенности вакцины и её эффективности в профилактике ротавирусной инфекции.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Создана и внедрена чувствительная и специфичная тест-система на основе иммуноферментного анализа для определения IgG и IgA антител к ротавирусу А на различных моделях животных.
2. Разработана и валидирована методика оценки показателя «специфическая активность» вакцины для использования при её выпуске в рамках нормативной документации.
3. Результаты безопасности, иммуногенности и протективности вакцины на модели новорожденных карликовых свиней позволяют характеризовать ее как перспективную для дальнейшего тестирования в клинических испытаниях.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия по следующим областям исследования:

1. Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ.
2. Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств.
3. Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность полученных результатов обусловлена использованием достаточного объема фактического материала, применением адекватных поставленным задачам методов исследования и использованием современных методов статистической обработки экспериментальных данных. Достоверность результатов была обеспечена статистической обработкой полученных результатов при уровне значимости  $<0,05$ . В работе в ходе валидации определена специфичность, повторяемость (не более 15 %) и промежуточная прецизионность (не более 15 %). В работе использованы стандартные положительные и отрицательные стандартные образцы предприятия. Проведено количественное моделирование с усвоением экспериментальных данных.

**Апробация результатов диссертационной работы.** Апробация работы была проведена на расширенном заседании лаборатории молекулярной диагностики в составе Испытательного Центра совместно с производителем лекарственных средств «Медгамал» филиалом ФГБУ «НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол №12 от 16.10.2025).

Результаты работы были представлены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы профилактики инфекционных и неинфекционных болезней: эпидемиологические, организационные и гигиенические аспекты», 2022 г., на «Первом Российском конгрессе медицинской микробиологии», г. Москва, 2023 г., «VII Съезде биофизиков России», г. Краснодар, 2023 г. и на заседаниях ученого совета ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России.

**Личный вклад автора.** Личный вклад автора заключался в организации и проведении экспериментов, анализе результатов, интерпретации данных, а также разработке и тестировании гипотез. Автор уделял особое внимание качеству проведенных исследований, обеспечивая выполнение всех этапов согласно установленным протоколам и стандартам. Кроме того, автор активно участвовал в критическом обсуждении полученных результатов с коллегами и научными руководителями, что способствовало выявлению новых перспектив и направлений для дальнейших исследований. Вклад автора также проявился в подготовке научных публикаций, презентациях на конференциях. Суммарное личное участие автора в работе составляет не менее 70%.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, списка используемой литературы, включающего 11 отечественных и 174 зарубежных источников. Диссертация иллюстрирована таблицами 29 и 15 рисунками.

**Публикации.** По результатам диссертационной работы опубликовано 5 работ: 4 статьи в научных изданиях, рекомендуемых ВАК и индексируемых в международных базах цитирования (Scopus и CAS), 1 патент Российской Федерации.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.**

**Глава 1** посвящена *обзору литературы* по теме диссертационного исследования.

В **Главе 2** диссертационной работы описаны материалы и методы, использованные в исследованиях:

**Вакцина.** Вакцина представляет собой рекомбинантные вирусоподобные частицы (VLP), сформированные белками нуклеокапсида (VP2, VP6) и поверхностными белками VP4 (P) и VP7 (G) 6 генотипов (G1, G2, G4, G9, P4, P8) ротавируса типа А, синтезированные в бакуловирусной системе экспрессии, смешанные с водно-масляным адъювантом на основе сквалена в соотношении 1:1

**РВА-специфические сыворотки мышей.** Использовали самок мышей линии BALB/c 3–4-недельного возраста, массой 16–18 г двукратно иммунизировали вакциной «Гам-VLP-рота»

с интервалом 14 суток. Через 7 суток после 2-й иммунизации получали сыворотку крови и определяли уровень антител к РВА методом непрямого ИФА.

**РВА-специфические сыворотки свиней.** Использовали сыворотку крови карликовых свиней после трёхкратной иммунизации с интервалом 10 суток вакциной «Гам-VLP-рота». Контрольным животным вводили 0,9% NaCl. Уровень РВА-специфических антител классов IgG и IgA определяли методом непрямого ИФА.

**РВА-специфические сыворотки морских свинок.** В экспериментах были использованы морские свинки «*Dasyprocta aguti*» иммунизированных двукратно с интервалом 14 дней вакциной «Гам-VLP-рота». Контрольным животным вводили 0,9% NaCl. Уровень РВА-специфических антител IgG-изотипа определяли методом непрямого ИФА.

**Получение и очистка рекомбинантных VLP VP2VP6 белков.** Трансфекцию перевиваемой линии клеток *Spodoptera frugiperda* Sf-21 осуществляли очищенными препаратами бакмидной ДНК (бак-RVA) с применением катионного липосомного агента Cellfectin («Invitrogen»), затем проводили 2 пассажа и выполняли коинфекцию перевиваемой клеточной культуры *Trichoplusia ni* и культивировали 7 суток. Культуральную жидкость осветляли, концентрировали и ультрацентрифугировали. Ресуспендировали осадок в буфере TNC и хранили при 4°C.

**Электронная микроскопия.** Исследование производили в просвечивающем электронном микроскопе JEOL 2100 (JEOL, Япония).

**Электрофорез и иммуноблоттинг.** Электрофорез проводили на приборе Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, США) в восстанавливающих условиях в соответствии с инструкцией производителя. После электрофоретического разделения белки из геля переносили на мембрану «Immobilon-P» (Millipore, США) на приборе Trans-Blot SD (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией производителя. Мембраны инкубировали с предварительно подобранными положительными или отрицательными сыворотками крови, обрабатывали соответствующими пероксидазными конъюгатами и визуализировали полосы смесью 3,3'-диамино-бензидина и 4-хлоронафтола с 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**ИФА для выявления антител к ротавирусу.** Титр специфических IgG к белкам VP2/6 в сыворотке крови иммунизированных животных определяли методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) как описано (Филатов, 2024).

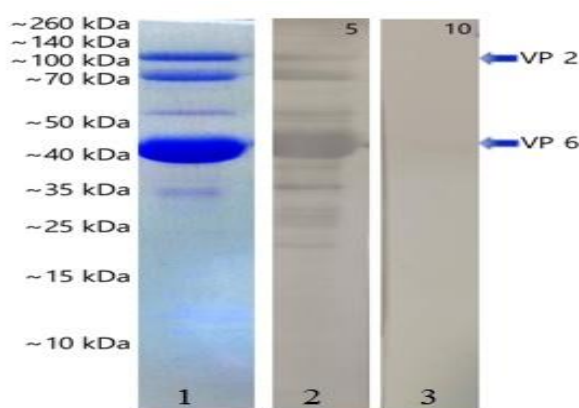
**ОТ-ПЦР в реальном времени.** Обнаружение РНК ротавируса типа А в ректальных смывах проводили с помощью набора реагентов для амплификации и дифференциации кДНК ротавирусов группы А (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

**Статистический анализ** Полученные данные обрабатывали с помощью программы Prism Graphpad 8.4.3 (GraphPad Software, США). Статистический анализ проводили с помощью программы STATISTICA 12.6 (StatSoft Inc., США). Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Статистически значимым считалось значение  $p < 0,05$ . При разработке и валидации метода контроля специфической активности препарата статистическую обработку проводили с использованием программного пакета Origin Pro 2023 (США). Для полученных данных в ИФА и реакции вирусной нейтрализации определяли среднее геометрическое значение титра антител (GM) с указанием значений 95% доверительного интервала (95% CI).

**Глава 3** диссертационной работы посвящена *результатам исследования и их обсуждению*.

### **Разработка тест-системы непрямого ИФА для оценки гуморального иммунного ответа у животных**

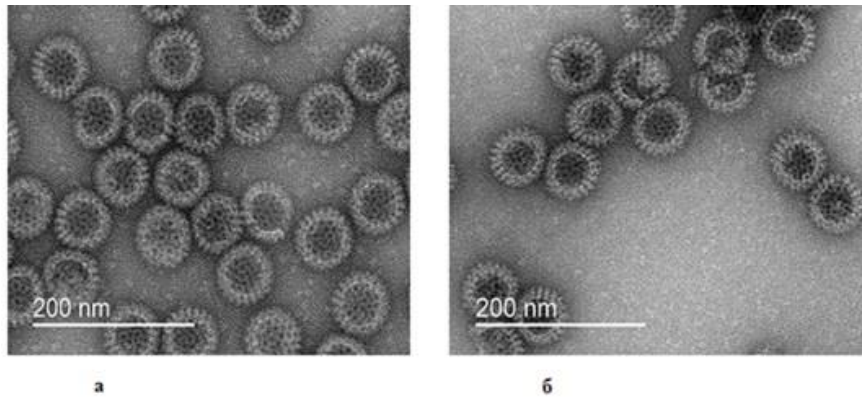
В рамках решения задач фармацевтической химии для гуморального и секреторного иммунных ответов на введение препарата «Гам-VLP-рота» необходимым инструментом является комплекс методов, в данном случае ИФА, для определения антител классов IgG, IgA в сыворотках крови иммунизированных животных. На первых этапах исследований первоочередной задачей было получение чувствительной и специфичной тест-системы ИФА, для дальнейшего ее использования при оценке иммуногенных свойств вакцины. Для этого был синтезирован антиген, в виде двуслойных VLP, содержащий капсид ротавируса, состоящий из белков VP2 и VP6 с молекулярной массой приблизительно 120 кД и 45 кД соответственно. Антигенная активность VP2/VP6 VLP РВА была подтверждена в иммуноблоттинге с РВА-положительными пробами сывороток крови свиньи (рис. 1).



**Рисунок 1.** Характеристика чистоты и иммуносpezifичности белков VLP VP2/VP6: 1 - SDS- электрофорез в 12% полиакриламидном геле с окраской суммарного белка Кумасси G-250, 2 – иммуноблот VP2/VP6 после обработки РВА-положительной сывороткой свиньи, 3 - иммуноблот VP2/VP6 после обработки отрицательной сывороткой свиньи.

*Источник: Составлено автором*

Результаты электронной микроскопии показали, что по морфологии и размеру VLP VP2/VP6 PBA соответствовали вириону нативного вируса и представляли собой трёхслойный колесообразный капсид размером 50–80 нм (рисунок 2). При этом более 90% полученных частиц были собраны правильно и не разрушены, концентрация общего белка в растворе после проведённой очистки составила 10–20 мг/мл, что, вероятнее всего, и является количественным содержанием VLP VP2/VP6 PBA.

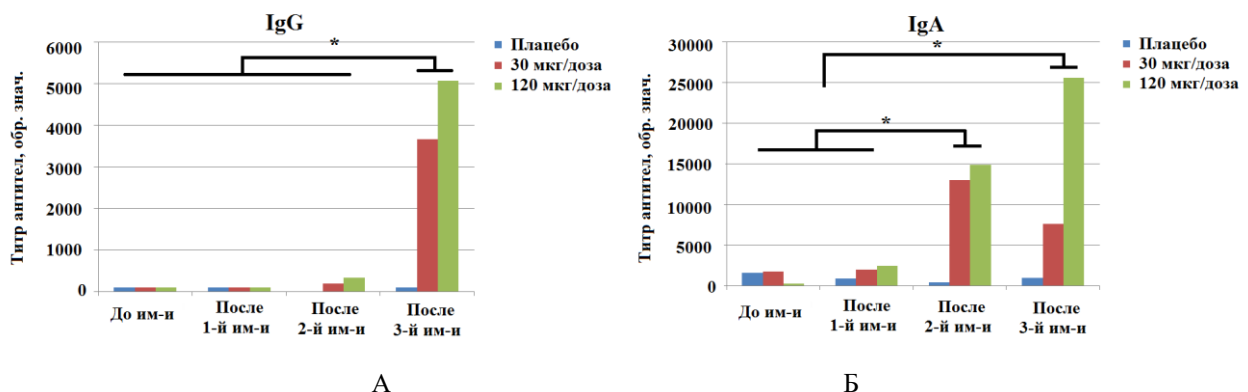


**Рисунок 2.** Электронная микрофотография VP2/VP6 VLP PBA (а) и PBA (б). Увеличение  $\times 25\,000$ .

*Источник: Составлено автором*

### Результаты оценки иммунного ответа после иммунизации вакциной Гам-VLP-рота у новорожденных карликовых свиней

Из наиболее релевантных человеку видов лабораторных животных для изучения РВ являются новорожденные поросята, в частном случае новорожденные поросята от карликовых свиней. Экспериментально доказана эффективность данного вида животных в качестве универсальной модели для оценки иммуногенности и протективной активности вакцин против РВ, что обусловлено значительным сходством в физиологическом развитии, анатомических аспектах и механизмах формирования системного и местного иммунитета младенцев и новорожденных поросят (Латышев О.Е., 2019).



**Рисунок 3.** Распределение сывороточных (А) IgG и (Б) IgA антител в иммунном ответе к РВА в опыте на новорождённых карликовых поросятах. В качестве антигена использован VP2/VP6 VLP PBA, испытуемые пробы отобраны до, после первой, второй и третьей

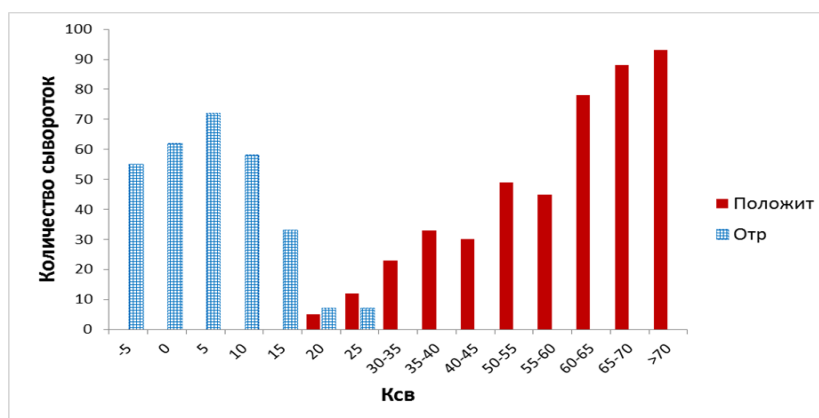
иммунизации вакциной «Гам-VLP-рота», соответственно. Приведены среднегеометрические показатели значения обратного титра.

*Источник: Составлено автором*

На рисунках 3А и 3Б видно, что трёхкратная иммунизация свиней вакциной «Гам-VLP-рота» 30 мкг и 120 мкг белка в дозе приводит к формированию сильного специфического иммунного ответа. Данные подтверждают способность рек-VP2VP6 белков, собранных в VLP, связывать специфические антитела классов IgG и IgA у иммунизированных животных.

### **Определение чувствительности и специфичности тест-системы ИФА**

В рамках задач фармации при разработке методики ИФА для выявления и определения уровня сывороточных антител IgG-класса к РВА свиней, препарат VLP VP2/VP6 РВА использовали в качестве антигена для сорбции на планшет в оптимальной концентрации 5 мкг/мл. «Отсекающее» значения Ксв, позволяющее дискриминировать положительные и отрицательные пробы, установили с помощью панели, состоящей из 456 РВА-положительных и 294 отрицательных сывороток крови свиней, предварительно подобранных с помощью набора-сравнения (рис. 4).



**Рисунок 4.** Распределение отрицательных и положительных сывороток крови свиней в ИФА в зависимости от Ксв.

*Источник: Составлено автором*

Из полученных данных следует, что большинство положительных сывороток имели Ксв больше 20%, а у отрицательных эта величина была ниже. Следовательно, значение Ксв, позволяющее дискриминировать положительные и отрицательные сыворотки равно 20%.

При параллельном исследовании панели РВА-положительных и отрицательных сывороток крови свиней (n=140) из различных свиноводческих хозяйств разработанной тест-системой и набором сравнения (таблица 1) определили диагностические параметры созданного продукта – чувствительность и специфичность, которые рассчитывали по формулам:

$$\text{чувствительность} = \frac{a}{a + c} \times 100\%$$

$$\text{специфичность} = \frac{d}{d+b} \times 100\%$$

**Таблица 1.** Результаты исследования сывороток крови свиней для расчета чувствительности и специфичности тест-системы.

|                                           |               | Результат ИФА INgezim ROTAVIRUS PORCINO |                       |
|-------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------|-----------------------|
|                                           |               | Положительных<br>n=53                   | Отрицательных<br>n=87 |
| Результат ИФА разработанной тест-системой | Положительных | a=51                                    | b=4                   |
|                                           | Отрицательных | c =2                                    | d=83                  |

В нашем случае диагностическая чувствительность и специфичность тест-системы составили 96,2 % и 95,4 % соответственно.

Таким образом, разработанная тест-система показала высокую диагностическую чувствительность и специфичность, а также достаточно узкую «серую зону» при дискриминации положительных и отрицательных проб (20 – 25 % Ксв).

#### **Валидация методики оценки специфической активности вакцины «Гам-VLP-рота»**

Для решения задач фармацевтической химии валидация проводилась в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XV изд. ОФС.1.1.0012 (Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1; 2023.) для экспериментального подтверждения пригодности метода непрямого ИФА для определения антител, специфических к ротавирусу А, в сыворотках крови иммунизированных морских свинок с целью контроля вакцинного препарата. Программа валидации включала исследование специфичности, повторяемости, внутрисерийной и межсерийной прецизионности.

Критерии показателя специфичность:

- среднее значение оптической плотности (A450) в лунках с фоном реак-ции (КР) не должно превышать 0,1, что также подтверждает отсутствие влияния компонентов БР на результаты реакции;
- среднее значение A450 в лунках с К- не более 0,2;
- A450 модельных растворов, содержащих антитела, специфичные к белкам VP2/6 ротавируса А, пропорциональна разведению модельных растворов.

Результаты оценки специфичности метода представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** Результаты оценки специфичности метода ИФА.

| Разведение<br>Наименование<br>образца | Значения A <sub>450</sub> |       |       |       |        |        |        |         |
|---------------------------------------|---------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|
|                                       | 1:100                     | 1:200 | 1:400 | 1:800 | 1:1600 | 1:3200 | 1:6400 | 1:12800 |

Продолжение таблицы 2

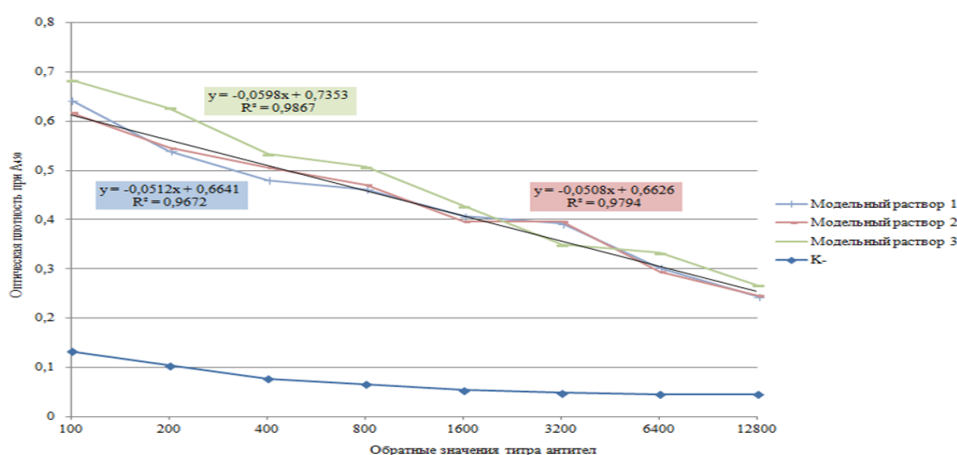
|                                                               |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Сыворотка крови не иммунизированного животного №1             | 0,136 | 0,105 | 0,079 | 0,068 | 0,055 | 0,048 | 0,046 | 0,046 |
| Сыворотка крови не иммунизированного животного №2             | 0,129 | 0,101 | 0,074 | 0,066 | 0,053 | 0,049 | 0,046 | 0,045 |
| Сыворотка крови не иммунизированного животного №3             | 0,135 | 0,106 | 0,077 | 0,065 | 0,055 | 0,048 | 0,046 | 0,046 |
| Стандартное отклонение (SD)                                   | 0,004 | 0,003 | 0,003 | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 0,000 | 0,001 |
| Среднее значение К- по каждому разведению                     | 0,133 | 0,104 | 0,077 | 0,066 | 0,054 | 0,048 | 0,046 | 0,046 |
| Среднее значение К-                                           | 0,072 |       |       |       |       |       |       |       |
| Коэффициент вариации (CV, %)                                  | 2,8   | 2,5   | 3,3   | 2,3   | 2,1   | 1,2   | 0     | 1,3   |
| Модельный раствор №1                                          | 0,643 | 0,539 | 0,480 | 0,462 | 0,407 | 0,392 | 0,302 | 0,243 |
| Модельный раствор №2                                          | 0,618 | 0,546 | 0,506 | 0,470 | 0,396 | 0,396 | 0,294 | 0,246 |
| Модельный раствор №3                                          | 0,684 | 0,627 | 0,534 | 0,508 | 0,427 | 0,349 | 0,333 | 0,267 |
| Поликлональная гипериммунная сыворотка морской свинки (1:100) | 0,697 | 0,695 | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| Контроль реагентов                                            | 0,049 | 0,046 | -     | -     | -     | -     | -     | -     |

Полученные результаты подлежат учету, т.к. выполнены установленные критерии приемлемости:

- среднее значение A450 в лунках разведений (К-) = 0,072 (не более 0,2);
- среднее значение A450 в лунках (К+) = 0,697/0,695 (не менее 0,6);
- среднее значение A450 в лунках с КР = 0,049/ 0,046 (не должно превышать 0,1).

Подтверждено отсутствие влияния буферного раствора на результаты контроля.

Зависимость A450 модельных растворов от количественного содержания специфических к ротавирусу А антител представлена на рисунке 5. Для оценки повторяемости результатов в качестве образцов были использованы сыворотки крови морских свинок, иммунизированных вакциной на основе VLP для профилактики ротавирусной инфекции (30 мкг/доза), и сыворотки контрольных морских свинок (не иммунизированных). Был произведен расчет среднего значения обратной величины титра IgG к VP 2/6 ротавируса А, стандартного отклонения (SD) и коэффициента вариации (CV, %).



**Рисунок 5.** Калибровочный график зависимости оптической плотности модельных растворов от количественного содержания специфических к ротавирусу А антител, построенный с использованием метода линейной регрессии. На графике представлены формулы регрессионного уравнения и значения R2 для каждого модельного раствора.

*Источник: Составлено автором*

Критерий приемлемости. Коэффициент вариации (CV, %) результатов, полученных в условиях повторяемости, не должен быть более 15%.

Результаты оценки повторяемости метода соответствуют критериям приемлемости и представлены в таблице 3.

**Таблица 3.** Результаты оценки повторяемости метода ИФА.

| Серия вакцины | Средняя обратная величина титра IgG к VP2/6 | SD     | CV, % |
|---------------|---------------------------------------------|--------|-------|
| 01            | 24800                                       | 3063,8 | 12,4  |
| 02            | 24000                                       | 1847,5 | 7,7   |

Значения коэффициента вариации как для 1 серии (12,4%), так и для 2 серии вакцины (7,7%) не превышали 15%, что говорит о повторяемости методики.

Для оценки промежуточной прецизионности метода проводили анализ тех же образцов сывороток морских свинок, что и при оценке повторяемости, на следующий день.

Критерий приемлемости. Для оценки точности методики сравнивали результаты исследований повторяемости и промежуточной прецизионности. Достоверность средних результатов ( $P = 95\%$ ) определяли по критерию t-Стьюдента.

Табличное значение критерия Стьюдента ( $t_{\text{табл}}$ ) ( $P = 95\%$ ,  $f = n_1 + n_2 - 2 = 6$ ) = 2,45

Результаты оценки промежуточной прецизионности соответствуют критериям приемлемости и представлены в таблице 4.

Значения коэффициента вариации как для 1 серии (6,9%), так и для 2 серии вакцины (10,2%) не превышали 15%, что говорит о внутрилабораторной прецизионности метода.

**Таблица 4.** Результаты оценки повторяемости метода ИФА (в условиях промежуточной прецизионности).

| Серия вакцины | Средняя обратная величина титра IgG к VP2/6 | SD   | CV, % |
|---------------|---------------------------------------------|------|-------|
| 01            | 23200                                       | 1600 | 6,9   |
| 02            | 25600                                       | 1600 | 10,2  |

Рассчитанное значение критерия Стьюдента ( $t_{рас} = 0$ ) менее табличного значения ( $t_{табл} = 2,45$ ), что свидетельствует об отсутствии существенных различий в воспроизводимости данных, полученных при исследовании повторяемости и промежуточной прецизионности метода.

В ходе валидационных испытаний на основании полученных результатов установлено, что методика определения титра специфических иммуноглобулинов класса G к VP2/6 ротавируса A в сыворотках крови морских свинок, вакцинированных «Гам-VLP-рота» (30 мкг/доза), методом иммуноферментного анализа удовлетворяет критериям приемлемости по тестам: специфичность (соответствует критериям приемлемости), повторяемость (для 1 серии - 12,4%, 2 серии вакцины - 7,7%) и промежуточная прецизионность (для 1 серии - 6,9%, 2 серии вакцины - 10,2%), что гарантирует получение достоверных результатов анализа и может использоваться для контроля показателей качества вакцины.

#### **Исследование безопасности, иммуногенности и протективной активности вакцины «Гам-VLP-рота»**

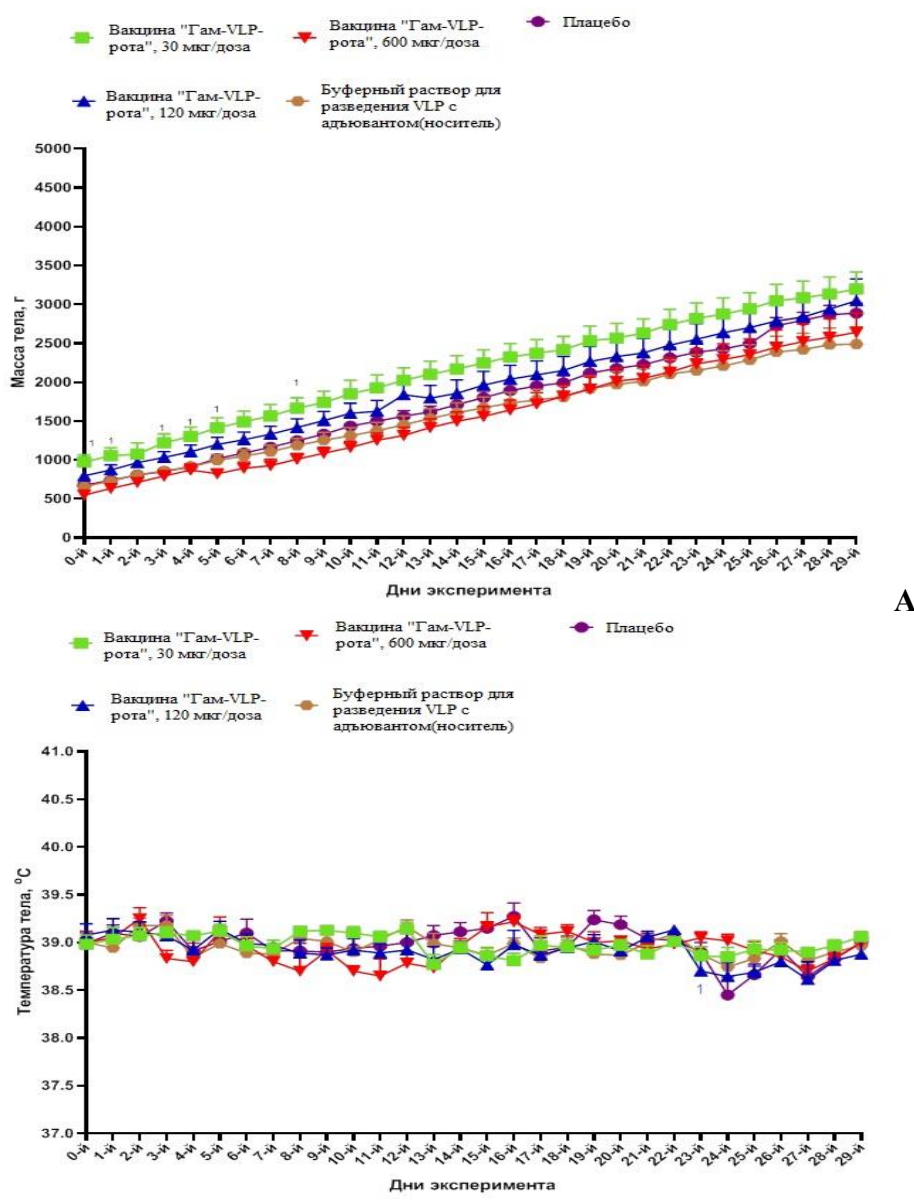
Для оценки безопасности, иммуногенности и протективной активности вакцины «Гам-VLP-рота» использовали модель новорожденных карликовых свиней, полученных от свиноматок, не имеющих специфических антител к ротавирусу. Животные были разделены на 5 групп: группа №1 - 11 животных, группа, №2 - 10 животных, группа №3- 6 животных, группа №4 - 9 животных, группа №5 - 8 животных. Для оценки безопасности были изучены результаты всех групп животных, а для оценки иммуногенности и эффективности животные из групп №1, 2, 5 (30 мкг/доза, 120 мкг/доза, плацебо).

#### **Результаты исследования безопасности вакцины на модели карликовых свиней.**

В рамках фармацевтической химии для исследования безопасности вакцины «Гам-VLP-рота» для профилактики ротавирусной инфекции была изучена динамика изменения массы, температуры тела животных. Так же были проанализированы основные гематологические и биохимические показатели крови подопытных карликовых свиней перед каждой иммунизацией и эвтаназией.

В течение всего эксперимента наблюдался положительный прирост массы тела животных в экспериментальных группах, что коррелирует с динамикой изменения массы тела у контрольной группы (рис. 6А). в течение исследования у опытных групп животных

наблюдались физиологические колебания температуры тела (рис. 6Б). Аналогичная картина наблюдалась у подопытных, получавших контрольное вещество и физиологический раствор.



**Рисунок 6.** А - график изменения массы тела поросят, Б - график изменения ректальной температуры тела поросят в течение периода иммунизации.

*Источник: Составлено автором*

Полученные данные свидетельствуют о нормальной общей переносимости вводимого препарата во всём диапазоне доз.

По результатам гематологического анализа крови (исследование уровня гемоглобина, гематокрит, количество эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов) и биохимического анализа крови (уровень глюкозы, общего холестерина, триглицеридов, мочевины, общего билирубина, креатинина, содержание общего белка, альбумина, глобулина, активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и щелочной фосфатазы) не выявлено негативного влияния тестируемой вакцины на

биохимические и гематологические показатели крови подопытных поросят при трёхкратной иммунизации.

**Результаты исследования безопасности вакцины «Гам-VLP-рота» на красках SD при однократном внутримышечном введении.**

В рамках фармации для изучения безопасности было проведено исследование токсичности вакцины на красках SD при однократном внутримышечном введении в том же диапазоне доз. Выявленные отличия либо были следствием разнонаправленных колебаний относительно значений группы носителя, либо носили характер флуктуации.

Результаты микроскопического обследования органов и области введения вакцины в остром периоде, а также через 14 дней позволяют сделать заключение о том, что вакцина «Гам-VLP-рота» в дозе 600 мкг после однократной внутримышечной инъекции не оказала общетоксического и местно-раздражающего действия. Через 14 дней после введения было обнаружено увеличение паховых лимфатических узлов без признаков воспалительной патологии, что расценено как реактивные изменения.

Таким образом, установлено, что вакцина против ротавирусной инфекции человека на основе VLP «Гам-VLP-рота», с различным содержанием антигена, включая максимальную (600 мкг/доза, превышающая минимальную клиническую в 20 раз), не вызывает неблагоприятных эффектов и является безопасной.

**Результаты исследования иммуногенности вакцины на модели карликовых свиней.**

Для решения задачи фармацевтической химии оценивали гуморальный иммунный ответ, определением уровня титра специфических антител класса IgG, IgA в сыворотке крови животных методом ИФА, а также уровня вируснейтрализующих антител в реакции нейтрализации до и после каждой иммунизации. Результаты представлены в таблице 5.

**Таблица 5.** Обратные значения титров антиген-специфических IgG, IgA и ВНА антител в сыворотке крови поросят после второй и третьей иммунизации вакцинами «Гам-VLP-рота», содержащих 30 мкг и 120 мкг в дозе (GM – среднее геометрическое, m – среднее арифметическое, M – медиана).

| Группа |                            | После 2 вакцинации |              |            | После 3 вакцинации |             |             |
|--------|----------------------------|--------------------|--------------|------------|--------------------|-------------|-------------|
|        |                            | GM<br>[95% CI]     | m            | M          | GM<br>[95% CI]     | m           | M           |
|        |                            |                    | ±SEM         | [IQR]      |                    | ±SEM        | [IQR]       |
| IgG    | Вакцина<br>30<br>мкг/доза  | <b>200</b>         | <b>180</b>   | <b>200</b> | <b>3676</b>        | <b>4480</b> | <b>3200</b> |
|        |                            | [105,3-379,7]      | ±74,2        | [50-200]   | [2330,5-5797,7]    | ±1061,3     | [2400-4800] |
|        | Вакцина<br>120<br>мкг/доза | <b>342,9</b>       | <b>444,4</b> | <b>400</b> | <b>5080</b>        | <b>5688</b> | <b>6400</b> |
|        |                            | [180,7-650,5]      | ±97,3        | [150-800]  | [3485,3-7403,5]    | ±1036,6     | [3200-6400] |

Продолжение таблицы 5

|     |                            |               |              |            |                |             |             |
|-----|----------------------------|---------------|--------------|------------|----------------|-------------|-------------|
| IgA | Вакцина<br>30<br>мкг/доза  | <b>114,8</b>  | <b>60</b>    | <b>100</b> | <b>918,9</b>   | <b>1120</b> | <b>800</b>  |
|     |                            | [57,4-167,34] | ±22,1        | [0-100]    | [630,4-1338,9] | ±265,3      | [600-1200]  |
|     | Вакцина<br>120<br>мкг/доза | <b>123,1</b>  | <b>133,3</b> | <b>100</b> | <b>1270</b>    | <b>1422</b> | <b>1600</b> |
|     |                            | [84,4-179,5]  | ±16,7        | [100-200]  | [871,2-1851,2] | ±259,2      | [800-1600]  |
| ВНА | Вакцина<br>30<br>мкг/доза  | <b>114,8</b>  | <b>60</b>    | <b>100</b> | <b>918,9</b>   | <b>1120</b> | <b>800</b>  |
|     |                            | [57,4-167,34] | ±22,1        | [0-100]    | [630,4-1338,9] | ±265,3      | [600-1200]  |
|     | Вакцина<br>120<br>мкг/доза | <b>123,1</b>  | <b>133,3</b> | <b>100</b> | <b>1270</b>    | <b>1422</b> | <b>1600</b> |
|     |                            | [84,4-179,5]  | ±16,7        | [100-200]  | [871,2-1851,2] | ±259,2      | [800-1600]  |

Примечание: в группе плацебо все исследуемые показатели на протяжении всего исследования были равны «0»

Уровень IgG антител статистически значимо увеличивается минимум на порядок после третьей иммунизации по сравнению с уровнем антител после второй иммунизации при вакцинации вакцин с обеими исследуемыми дозами антигена 30 мкг ( $p=0,008$ ) и 120 мкг ( $p=0,008$ ) у 100% животных. При этом уровень антител выше после двукратной иммунизации вакциной, содержащей 120 мкг антигена в дозе, по сравнению с вакциной, содержащей 30 мкг антигена в дозе ( $p=0,043$ ), тогда как после третьей иммунизации титр антиген-специфических IgG достоверно не отличается в зависимости от используемой дозы ( $p=0,428$ ).

Уровень IgA антител статистически значимо увеличивается приблизительно в 10 раз после третьей иммунизации по сравнению с уровнем антител после второй иммунизации при вакцинации вакцинами, содержащими обе исследуемые дозы антигена 30 мкг ( $p=0,008$ ) и 120 мкг ( $p=0,007$ ) у 100% животных. Примечательно, что аналогично с уровнем IgG, уровень IgA антител выше после двукратной иммунизации вакциной, содержащей 20 мкг антигена в дозе, по сравнению с вакциной, содержащей 30 мкг антигена в дозе ( $p=0,019$ ), тогда как после третьей иммунизации титр антиген-специфических IgA достоверно не отличается в зависимости от используемой дозы ( $p=0,428$ ).

Уровень нейтрализующих антител статистически значимо увеличивается приблизительно в 10 раз после третьей иммунизации по сравнению с уровнем нейтрализующих антител после второй иммунизации при вакцинации препаратами, содержащими обе исследуемые дозы 30 мкг ( $p=0,008$ ) и 120 мкг ( $p=0,007$ ) у 100% животных. Уровень нейтрализующих антител выше после трехкратной иммунизации вакциной, содержащей 120 мкг антигена в дозе, по сравнению с вакциной, содержащей 30 мкг антигена в дозе ( $p=0,019$ ), тогда как после второй иммунизации титр нейтрализующих антител достоверно не отличается в зависимости от используемой дозы ( $p=0,065$ ).

Таким образом, показано, что вакцина «Гам-VLP-рота» приводит к формированию гуморального иммунного ответа при иммунизации поросят вакцинами, содержащими как 30 мкг антигена в дозе вакцины, так и 120 мкг.

Для оценки клеточного иммунного ответа проводили реакцию бласттрансформации лимфоцитов периферической крови животных после каждой иммунизации (Таблица 6).

**Таблица 6.** Средние групповые значения индекса стимуляции пролиферации (ИСП) моноцитов периферической крови поросят после трех иммунизаций вакциной «Гам-VLP-рота», ( $p<0,05$ ).

| Группа               | После 1-й иммунизации | После 2-й иммунизации | После 3-й иммунизации |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Плацебо              | 1,1±0,1               | 1±0,1                 | 1,3±0,2               |
| Вакцина 30 мкг/доза  | 1,7±0,3               | 2,5±0,3               | 3,4±0,5               |
| Вакцина 120 мкг/доза | 2,1±0,04              | 2,1±0,03              | 1,7±0,04              |

Так же проводили реакцию РБТЛ мононуклеаров крови, селезенки и брыжеечных лимфоузлов после третьей иммунизации вакциной «Гам-VLP-рота». Результаты полученных данных представлены в таблице 7.

**Таблица 7.** Средние групповые значения индекса стимуляции пролиферации (ИСП) мононуклеаров крови, селезенки и брыжеечных лимфоузлов поросят после третьей иммунизаций вакциной «Гам-VLP-рота», ( $p<0,05$ ).

| Группа               | Кровь   | Селезенка | Брыжеечные лимфоузлы |
|----------------------|---------|-----------|----------------------|
| Плацебо              | 1±0,1   | 1±0,1     | 1,3±0,3              |
| Вакцина 30 мкг/доза  | 4,6±0,6 | 3,4±0,6   | 3,6±0,6              |
| Вакцина 120 мкг/доза | 1,2±0,1 | 2,5±0,4   | 3,4±0,8              |

Результаты РБТЛ показали, что вакцина с минимальной используемой концентрацией антигена - 30 мкг в дозе способна стимулировать пролиферацию моноцитов периферической крови поросят при введении вакцины «Гам-VLP-рота» после второй и третьей иммунизации, при этом значение ИСП достоверно увеличивается в 2,6 раз по сравнению с группой плацебо ( $p<0,05$ ). Также только в этой группе отмечается достоверное и значительное увеличение ИСП после третьей иммунизации по сравнению с группой плацебо не только в крови, но и в мононуклеарах, выделенных из селезенки (в 3,4 раза) и брыжеечных лимфатических узлов (в 3 раза) ( $p<0,05$ ), в то время как в группе 120 мкг/доза статистически значимое увеличение ИСП

было только в мононуклеарах, выделенных из селезенок (в 2,5 раза) по сравнению с группой плацебо.

Результаты формирования IFN- $\gamma$ -секретирующих лимфоцитов в культуре клеток, выделенных из селезенок и брыжеечных лимфатических узлов поросят, на 10 сутки после третьей иммунизации представлены в таблице 8.

**Таблица 8.** Формирование IFN- $\gamma$ -секретирующих лимфоцитов в культуре клеток, выделенных из селезенок и брыжеечных лимфатических узлов поросят, иммунизированных вакциной «Гам-VLP-рота», содержащей разные дозы антигена на 10 сутки после третьей иммунизации.

| Группа                | Номер животного | Селезенка         |              | Лимфоузлы         |               |
|-----------------------|-----------------|-------------------|--------------|-------------------|---------------|
|                       |                 | Количество спотов | m $\pm$ SEM  | Количество спотов | m $\pm$ SEM   |
| Плацебо               | № 5.1           | 98                | 74 $\pm$ 22  | 84                | 44 $\pm$ 28   |
|                       | № 5.2           | 85                |              | 42                |               |
|                       | № 5.3           | 39                |              | 5                 |               |
| Вакцина, 30 мкг/доза  | № 1.6           | 173               | 138 $\pm$ 23 | 156               | 543 $\pm$ 310 |
|                       | № 1.7           | 129               |              | 1263              |               |
|                       | № 1.8           | 163               |              | 110               |               |
|                       | № 1.9           | 86                |              | 644               |               |
| Вакцина, 120 мкг/доза | № 2.1           | 286               | 322 $\pm$ 99 | 94                | 65 $\pm$ 19   |
|                       | № 2.2           | 191               |              | 39                |               |
|                       | № 2.3           | 240               |              | 34                |               |
|                       | № 2.4           | 571               |              | 93                |               |

Полученные результаты показали, что поросята, получившие три дозы вакцины в минимальной исследуемой концентрации 30 мкг/доза, потенциально способны к количественному эффективному клеточно-опосредованному иммунному ответу. Клеточный ответ является защитным, что подтверждается достоверно высоким ИСП в реакции РБТЛ при трехкратном введении вакцины ИСП 3,4 $\pm$ 0,5 (кровь); 3,4 $\pm$ 0,6 (селезенка) и 4,6 $\pm$ 0,6 (лимфоузлы), коррелирующим с интенсивным формированием IFN- $\gamma$  секретирующих клеток в селезенке и брыжеечных лимфоузлах.

Результаты оценки секреторного иммунитета представлены в таблице 9.

**Таблица 9.** Обратный титр антиген-специфических секреторных антител IgA в смывах кишечника.

| Группа                | IgA, GM [95% ДИ]   |
|-----------------------|--------------------|
| Плацебо               | 93 [41,2-497,7]    |
| Вакцина, 30 мкг/доза  | 673 [797,6-5249,8] |
| Вакцина, 120 мкг/доза | 1131 [701,5-4617]  |

Показано, что трёхкратная иммунизация вакциной на основе VLP, содержащая как 30 мкг, так и 120 мкг антигена в дозе, приводит к образованию секреторных IgA, что свидетельствует о формировании специфического секреторного иммунного ответа, не различающегося статистически значимо в зависимости от дозы антигена в вакцине ( $p>0,05$ ).

### Результаты оценки протективной активности вакцины

Для решения задачи фармации по оценке протективных свойств вакцины «Гам-VLP-рота» было проведено заражение поросят ротавирусом А человека штамма Wa G1P8 с инфекционной активностью  $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$  с последующим анализом на содержание РНК ротавируса А человека в ректальных мазках методом ОТ-ПЦР (таблица 10).

**Таблица 10.** Обнаружение РНК ротавируса А человека в смывах зараженных поросят, абс. зн. %.

| Группа                | Обнаружение РНК, % |         |         |
|-----------------------|--------------------|---------|---------|
|                       | 2 сутки            | 3 сутки | 4 сутки |
| Плацебо               | 75%                | 75%     | 60%     |
| Вакцина 30, мкг/доза  | 17%                | 17%     | 0%      |
| Вакцина 120, мкг/доза | 40%                | 40%     | 0%      |

Из представленных в таблице 10 данных видно, что иммунизация вакциной VLP вакциной, содержащей как 30 мкг, так и 120 мкг антигена в дозе, приводит к снижению репликации вируса. Результаты общего состояния животных из опытных групп в совокупности с данными результатов ОТ-ПЦР могут свидетельствовать о выраженных протективных свойствах вакцинного препарата на основе VLP, содержащей как 30 мкг, так и 120 мкг антигена в дозе.

### ВЫВОДЫ

1. В рамках решения задач фармацевтической химии, оптимизированы и стандартизированы методики подходов оценки безопасности, иммуногенности и протективности вакцины «Гам-VLP-рота» для профилактики ротавирусной инфекции.

2. Разработана чувствительная (96,2%) и специфичная (95,4%) тест-система на основе ИФА, предназначенная для выявления специфических антител различных классов у свиней на основе охарактеризованных двуслойных VLP (VP2VP6).

3. Разработана и валидирована методика оценки показателя «Специфическая активность» вакцины с использованием метода ИФА. Валидация разработанной методики на модели морских свинок показала ее специфичность (100%), повторяемость (CV для 1 серии - 12,4%, 2 серии вакцины - 7,7%) и промежуточную прецизионность (CV для 1 серии - 6,9%, 2 серии вакцины - 10,2%) при соблюдении критериев приемлемости.

4. В рамках изучения безопасности вакцины «Гам-VLP-рота» определены гематологические, биохимические показатели крови карликовых свиней и показано отсутствие статистически значимых различий у вакцинированных и контрольных животных. Показано отсутствие температурной реакции и аналогичной динамика изменения массы тела животных, что в совокупности с данными, полученными в ходе исследования острой токсичности вакцины на крысах SD, свидетельствует о потенциальной безопасности вакцины «Гам-VLP-рота» для человека.

5. Определена динамика показателей гуморального и клеточного иммунных ответов с карликовых свиней в процессе иммуногенеза после применения вакцины «Гам-VLP-рота». Установлено статистически достоверное дозозависимое увеличение титра IgG, IgA и вируснейтрализующих антител в сыворотке крови животных после третьей иммунизации вакциной при различных дозах антигена. Определено статистически достоверное увеличение ИСП лимфоцитов крови и брыжеечных лимфоузлов (в 3,6 раза) у поросят после третьей иммунизации вакциной «Гам-VLP-рота» в дозе 30 мкг ( $p < 0,05$ ). Показано, что применение вакцины «Гам-VLP-рота» с различным содержанием антигена в дозе приводит к статистически достоверному ( $p < 0,05$ ) повышению количества IFN- $\gamma$ -секретирующих лимфоцитов в селезенке и брыжеечных лимфатических узлах поросят.

6. Установлен протективный эффект вакцины «Гам-VLP-рота» после трехкратного введения поросётам при разном содержании антигена. Отрицательная реакция ОТ-ПЦР в 100% исследуемых ректальных мазках на 4-е сутки после экспериментального заражения однозначно свидетельствует об отсутствии репликации ротавируса А в организме вакцинированных животных.

#### **Список сокращений и условных обозначений**

**ВНА** – вирус нейтрализующие антитела

**ДИ** – доверительный интервал

**ИФА**- иммуноферментный анализ

**ИСП** – индекс стимуляции пролиферации

**РБТЛ** – реакция бласттрансформации лимфоцитов

**РВ** – ротавирус

**РВА** – ротавирус А

**РВИ** – ротавирусная инфекция

**РН** – реакция нейтрализации

**CV** – коэффициент вариации

**GM** – среднее геометрическое

**IgA** – иммуноглобулин А

**IgG** – иммуноглобулин G

**SD** – стандартное отклонение

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

##### **Международные базы цитирования Scopus и CAS:**

1. **Филатов, И. Е.** Использование вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных вирусных белков VP2/VP6 ротавируса А для оценки гуморального иммунного ответа методом ИФА / И. Е. Филатов, В. В. Цибезов, М. В. Баландина, С. Н. Норкина, О. Е. Латышев, О. В.

Елисеева, С. А. Черепушкин, О. А. Верховский, Т.В. Гребенникова // Вопросы вирусологии. — 2023. — Т. 68. — № 2. — С. 161–171. DOI: 10.36233/0507-4088-169.

2. Костина, Л. В. Исследование безопасности и иммуногенности вакцины на основе VLP для профилактики ротавирусной инфекции на модели новорожденных карликовых свиней. / Л. В. Костина, **И. Е. Филатов**, О. В. Елисеева, О. Е. Латышев, Я. Ю. Чернорыж, К. И. Юрлов, Е. И. Леснова, К. М. Хаметова, С. А. Черепушкин, Т. Е. Савочкина, В. В. Цибезов, К. Л. Крышень, Л. И. Алексеева, Т. В. Гребенникова // Вопросы вирусологии. — 2023. — Т. 68. — N. 5. — С. 415–428. DOI:10.36233/0507-4088-194

3. **Филатов, И. Е.** Определение специфической активности ротавирусной вакцины на основе вирусоподобных частиц с использованием иммуноферментного анализа: разработка и валидация методики / **И. Е. Филатов**, М. М. Силаенкова, В. В. Цибезов, М. В. Баландина, С. Н. Норкина, О. Е. Латышев, О. В. Елисеева, С. А. Черепушкин, Т. В. Гребенникова// БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2024. — Т. 24. — N. 4. — С.435–448. DOI:10.30895/2221-996X-2024-24-4-389-402

4. Ledenev, O.V. Toxicity evaluation of a VLP-based vaccine against human rotavirus infection following a single administration in rats: serum biochemistry and histopathological examination of organs and injection site / O. V. Ledened, **I. E. Filatov**, O. V. Eliseeva, O. E. Latyshev, I. A. Dyachenko, G.A. Slashcheva, E. R. Shaykhutdinova, E. N. Kazakova, S. R. Sadovnikova, O. I. Patsap, V. V. Lebedeva, A. N. Murashev, T. V. Grebennikova // Journal of Drug Delivery and Therapeutics. — 2025. V.15. – N.8. — P. 69-79. DOI: 10.22270/jddt.v15i8.7314.

#### Патенты РФ:

5. Гребенникова, Т. В. Вакцина против ротавирусной инфекции человека на основе вирусоподобных частиц ротавируса: патент № 2829862 Рос. Федерация : МПК А61К 39/12 (2006.01) / Т. В. Гребенникова, О. В. Елисеева, Л. В. Костина, О. Е. Латышев, **И. Е. Филатов**, С. А. Черепушкин, В. В. Цибезов, О. Н. Зайкова, А. А. Плотников, В. В. Лебедева, М. А. Лосич, К. М. Хаметова, С. Н. Норкина, М. М. Силаенкова, К. А. Южакова, Н. Ю. Куликова, Л. М. Алимбарова, А. А. Лазаренко, Н. П. Банковская, Т. В. Крестьянова, З. Б. Иванова, А. Л. Гинцбург ; заявитель и патентообладатель ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России. — № 2024109876; заявл. 07.04.2024; опубл. 07.11.2024, Бюл. № 31. — 18 с.

**Филатов Илья Евгеньевич**

(Российская Федерация)

**ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ, ИММУНОГЕННОСТИ И ПРОТЕКТИВНОСТИ  
ВАКЦИНЫ «ГАМ-VLP-РОТА» ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ  
НА РЕЛЕВАНТНОЙ МОДЕЛИ ЖИВОТНЫХ**

Диссертационная работа посвящена разработке, оптимизации и стандартизации методов контроля безопасности, иммуногенности, протективности вакцины «Гам-VLP-рота» для профилактики ротавирусной инфекции. Создана и внедрена чувствительная и специфичная тест-система на основе иммуноферментного анализа для определения антител к ротавирусу А у различных животных. Разработана и валидирована методика оценки показателя «специфическая активность» вакцины для использования при её выпуске в рамках нормативной документации. Результаты безопасности, иммуногенности и протективности вакцины на модели новорожденных карликовых свиней позволяют характеризовать ее как перспективную для дальнейшего тестирования в клинических испытаниях.

**Filatov Ilya**

(Russian Federation)

**STUDIES OF THE SAFETY, IMMUNOGENICITY AND PROTECTIVENESS OF THE  
GAM-VLP-ROTA VACCINE FOR THE PREVENTION OF ROTAVIRUS INFECTION IN A  
RELEVANT ANIMAL MODEL**

This dissertation focuses on the development, optimization, and standardization of methods for monitoring the safety, immunogenicity, and protective efficacy of the Gam-VLP-Rota vaccine for the oral prophylaxis of viral infections. A sensitive and specific test system based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting antibodies to the A virus in various animals was developed and implemented. A method for assessing the vaccine's "specific activity" has been developed and validated for use during its release within the framework of regulatory documentation. Results of the vaccine's safety, immunogenicity, and protective efficacy in a neonatal minipig model suggest it has potential for further testing in clinical trials.