



**ГНУ «Институт экспериментальной патологии и терапии
Академии наук Абхазии», Сухум, Абхазия**

**Оценка безопасности и иммуногенности вакцинных препаратов на
неполовозрелых и половозрелых обезьянах Старого Света**

Зам. директора по научной работе
Зав. лаб. иммунологии и вирусологии
к.б.н., доцент Матуа А.З.

**28.06.2023
Санкт-Петербург**

Старейшим из ныне существующих приматологических центров в мире, является Сухумский питомник, созданный в 1927 г. специально для медицинских экспериментов вне районов естественного обитания обезьян.

В 1930 г. в США был организован Йеркский приматологический центр. Во второй половине XX века были созданы десятки питомников по всему миру, во многих странах Европы, Азии, США (больше всего в США).

Главной задачей Сухумского питомника и других приматологических центров на первых этапах работы было изучение нормативных показателей всех физиологических систем организма обезьян. Близость человека и обезьян оказалась уникальной.



**Памятник обезьянам за их заслуги перед
экспериментальной медициной в ИЭПиТ АНА**

Из-за сложного механизма действия вакцин или отсутствия на момент разработки вакцины эпидемии, исследования на животных обычно являются единственной возможностью охарактеризовать фармакологические и токсикологические свойства вакцин. Доклинические программы исследований для вакцин и адъювантов должны не только продемонстрировать, что вакцина является иммуногенной и обладает протективной эффективностью, но также обосновать безопасность препарата, связанную, в первую очередь, с технологическим процессом получения вакцин.

Начиная с 2000-х гг. ВОЗ и ведущими регуляторными органами мира было подготовлено более 40 нормативных документов, в которых описаны те или иные стороны проведения доклинических исследований эффективности и безопасности вакцин. Документы можно разделить на две группы: посвященные общим вопросам доклинических исследований вакцин, и касающиеся оценки качества, эффективности и безопасности определенных видов вакцин.

Таблица 1.

Нормативные документы, регламентирующие общий порядок проведения доклинических исследований эффективности и безопасности вакцин

Наименование документа <i>Document title</i>	Год утверждения <i>Year of approval</i>	Регуляторный орган, страна/регион <i>Regulatory authority, country/region</i>	Источник <i>Reference</i>
Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines (CPMP/SWP/465/95)	1998	ЕМА, ЕС <i>EMA, EU</i>	Сноска8 <i>Footnote8</i>
The Drugs and Cosmetics Act, 1940; and The Drugs and Cosmetics Rules, 1945	2005	МНФВ, Индия <i>MHFW, India</i>	Сноска9 <i>Footnote9</i>
WHO guidelines on non-clinical evaluation of vaccines, Annex 1, TRS No. 927	2005	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска10 <i>Footnote10</i>
Guideline on adjuvants in vaccines for human use (EMA/CHMP/ VEG/134716/2004)	2005	ЕМА, ЕС <i>EMA, EU</i>	Сноска11 <i>Footnote11</i>
Considerations for developmental toxicity studies for preventive and therapeutic vaccines for infectious disease indications. Guidance for industry	2006	FDA, США <i>FDA, USA</i>	Сноска12 <i>Footnote12</i>
Considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. Guidance for industry	2007	FDA, США <i>FDA, USA</i>	Сноска13 <i>Footnote13</i>
Guidelines for assuring the quality and non-clinical safety evaluation of DNA vaccines, Annex 1, TRS No. 941	2007	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска14 <i>Footnote14</i>
Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines (EMA/CHMP/ VWP/141697/2009)	2010	ЕМА, ЕС <i>EMA, EU</i>	Сноска15 <i>Footnote15</i>
Guideline for non-clinical studies of vaccines for preventing infectious diseases (PFSB/ELD Notification No. 0527-1)	2010	МНЛВ, Япония <i>MHLW, Japan</i>	Сноска16 <i>Footnote16</i>

Продолжение таблицы 1. Нормативные документы, регламентирующие общий порядок проведения доклинических исследований эффективности и безопасности вакцин

Наименование документа <i>Document title</i>	Год утверждения <i>Year of approval</i>	Регуляторный орган, страна/регион <i>Regulatory authority, country/region</i>	Источник <i>Reference</i>
Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты) <i>Guidelines for non-clinical studies of medicines (Immunobiological medicinal products)</i>	2012	ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Россия <i>Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health, Russia</i>	Сноска17 <i>Footnote17</i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of DT-based combined vaccines, Annex 6, TRS No. 980	2014	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска18 <i>Footnote18</i>
Guidelines on the non-clinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines, Annex 2, TRS No. 987	2014	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска19 <i>Footnote19</i>
Адъюванты вакцин для лечения и профилактики заболеваний человека (глава 16). Решение Совета ЕЭК № 89 <i>Adjuvants for vaccines to treat and prevent human diseases (Module 16). Decision No. 89 of the EEC</i>	2016	Совет ЕЭК, ЕАЭС <i>Council of the EEC, EAEU</i>	Сноска20 <i>Footnote20</i>
Guidelines on the quality, safety and efficacy of plasmid DNA vaccines, Annex 2, TRS No. 1028	2021	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска21 <i>Footnote21</i>

Цель: определение внутренних критериев оценки качества доклинического испытания



Основной целью проведения доклинического испытания вакцинного препарата является демонстрация эффективности и безопасности при введении вакцины человеку. Для демонстрации протективной эффективности обычно используются релевантные модели с заражением животных. Часто используемыми видами в исследованиях являются крысы, кролики и мыши. При этом в большинстве случаев адекватный иммунный ответ может быть показан только на приматах.

Макаки (Macaca) и павианы (Papio) - низшие (узконосые) обезьяны Старого Света - входят в один инфраотряд с высшими обезьянами (человекообразные) и человеком. Именно на обезьянах этого отряда выполнено большинство экспериментальных исследований в области медицинской приматологии – свыше 70%.

В первую очередь четырем родам (шимпанзе из высших и макакам, мартышкам, павианам из низших), человечество в большей мере обязано современными возможностями профилактики и лечения большинства опасных недугов человека.

Шимпанзе



- Опыт работ с обезьянами позволяет считать шимпанзе универсальными экспериментальными животными для изучения проблем физиологии и патологии человека . Однако, по понятным причинам, исследования на них ограничены.

Альтернативой являются низшие обезьяны Старого Света, наиболее часто используются в экспериментах макаки резусы, макаки яванские, павианы гамадрилы и павианы анубисы. Установленные биологические нормативы большинства физиологических систем макак и павианов сходны. Однако, имеющиеся видовые особенности, позволяют рекомендовать этих особей для разного рода экспериментов.

Павианы



- На сегодняшний день известно, что павианы наиболее удобны для изучения высшей нервной деятельности, сердечно-сосудистой патологии, репродуктивной физиологии, контрацепции, этиологии и эпидемиологии опухолевых заболеваний.

Макаки



- Для исследований по инфекционной патологии приоритетными являются макаки, они же широко используются в исследованиях по нейрофармакологии и токсикологии, а также являются предпочтительными и при других самых разнообразных экспериментах



Таким образом, учитывая видовую специфику, в каждом конкретном эксперименте используются наиболее адекватный вид обезьян. На сегодняшний день, предпочтение в доклинических испытаниях фармакологических и вакцинных препаратов отдается макакам, чаще яванским.

Перед началом эксперимента, в зависимости от дизайна исследования, определяется:

- 1. Вид, пол и возраст животных**
- 2. Группы (опыт, контроль)**
- 3. Клинические и лабораторно- инструментальные параметры**
- 4. Оборудование (автоматическое, полуавтоматическое)**
- 5. Персонал (задействованный на каждом этапе)**
- 6. Сроки проведения эксперимента**

Тема 1.8. «Оценка безопасности, иммуногенности рекомбинантной живой вакцины на экспериментальной модели обезьян», совместно с лабораторией генетики бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (г. Москва).

1. Экспериментальный коклюш у обезьян // Вестник РАМН, 2013, №8, с.28-33
2. Эпизоотический очаг коклюша у обезьян вида PAPIO GAMADRYAS //Инфектология.-2015.-Том 7.-№3.-С.103-111.
3. Инсерционная инактивация оперона вирулентности и персистенции бактерий Bordetella Pertussis при экспериментальном коклюше у низших обезьян // Генетика.-2016.-Том 52, №3. 1-9.
4. Доклинические исследования безопасности, иммуногенности и защитной активности аттенуированных бактерий на экспериментальной модели макаков резусов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2020. – Т.19. – №4. – С.312-323.
5. Безопасность и иммуногенность препарата живой коклюшной вакцины ГамЖВКинтраназального применения на экспериментальной модели младенцев обезьян вида павиан гамадрил // ЖМЭИ. – 2022.-Том 99.-№2 <https://doi.org/10.36233/0372-9311-190>

**По теме 1.8. работа проводилась на обезьянах 4х
возрастных групп (на разных этапах эксперимента)**



- 1. Детеныши - от 1 месяца до 1 года**
- 2. Неполовозрелые - от 1 года до 3-4 лет
(в зависимости от вида)**
- 3. Молодые половозрелые – от 4 до 11 лет**
- 4. Зрелого возраста - от 12 до 19 лет**

Ведущей частью доклинического испытания является лабораторное исследование биоматериала животных с соблюдением правил преаналитики, аналитики и постаналитики.



ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП

**До 70 % всех лабораторных ошибок
осуществляется на этапе преаналитики !
Львиная доля ошибок происходит при взятии
биоматериала.**

Преаналитический этап состоит:

- * Подготовка к исследованию**
- * Идентификация**
- * Взятие биоматериала**
- * Обработка биоматериала**
- * Хранение биоматериала**
- * Транспортировка биоматериала**

ВЗЯТИЕ КРОВИ ОСУЩЕСТВЛЯЮТ ОБУЧЕННЫЕ ФЛЕБОТОМИИ СПЕЦИАЛИСТЫ



Половозрелый павиан



Человек



Взятие крови вакуумными системами

Неполовозрелый павиан



Ребенок



Взятие крови вакуумными системами с применением игл-бабочек



**Осмотр детенышей павианов гамадрилов перед
взятием крови**

**Пятка детеныша павиана
гамадрила**



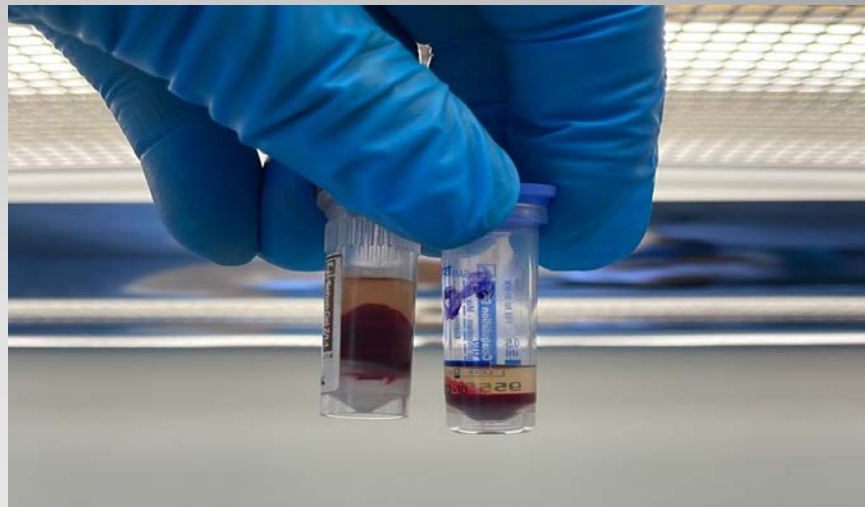
Пятка младенца



**Пяточное взятия крови у детенышей от 1 до 2х
месяцев ?**



**Паховое взятие крови у детенышей павианов
гамадрилов в возрасте от 1 до 2 месяцев**



Микропробирки для взятия крови

Обработка биоматериала

- **Приготовление проб из первичного образца включает все действия, требующиеся для того, чтобы сделать образец пригодным для анализа**
- **Например, приготовление плазмы или сыворотки, включает:**
 - * **центрифугирование**
 - * **отбор аликвот**
 - * **пипетирование**
 - * **разведение**
 - * **сортировку проб для автоматического анализа**

**Использование вакуумных систем взятия крови у экспериментальных обезьян снизило общую частоту гемолиза с 66,7% до 32,5% ($p < 0,001$), частичного гемолиза с 37,8 до 14,3%. При этом, выраженный гемолиз, который встречался ранее в 22,1% случаев был полностью нивелирован. Процент негемолизированных сывороток возрос с 33,3 до 67,5%.
(данные лаборатории биохимических исследований крови ИЭПиТ АНА)**

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП:

Представляет собой непосредственное исследование образца в лаборатории.

Контроль качества аналитического этапа - оценка результатов измерений контрольных образцов

Основной спектр лабораторных исследований:

- Гематологические
- Биохимические
- Иммунологические

Гематологические характеристики крови обезьян близки к таковым человека, выявлено структурное сходство клеток периферической крови (Huser H. T., 1970; Куксова М.И., 1972)

Гематологические параметры

(на гематологическом автоматическом анализаторе):

- Эритроциты (RBC)
- Гемоглобин (HGB)
- Гематокрит (HCT)
- Средний объем эритроцита (MCV)
- Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH)
- Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC)
- Тромбоциты (PLT)
- Лейкоциты (WBC)
- Нейтрофилы (NEU) палочкоядерные
- Нейтрофилы (NEU) сегментоядерные
- Эозинофилы (EOS)
- Базофилы (BAS)
- Моноциты (MON)
- Лимфоциты (LIM)
- СОЭ

Уже в начале 30-х годов сотрудниками Сухумского питомника были установлены одни из первых нормативных данных по углеводному и солевому обмену у обезьян, а также получены сведения о химическом составе крови, мочи и др. (Бочкарёв П.В., 1932; Бочкарёв П.В. и соавт., 1933).

Биохимические параметры

на биохимическом автоматическом анализаторе:

- Глюкоза
- Общий белок
- Альбумин
- Билирубин
- Аланинаминотрансфераза
- Аспартатаминотрансфераза
- Щелочная трансфераза
- Мочевина
- Азот мочевины
- Креатинин
- Холестерин общий
- Триглицериды

Многие исследования продемонстрировали, что целый ряд МкАТ, реагирующие с моноклеарными клетками периферической крови (МКПК) человека, перекрёстно реагируют с МКПК обезьян (Cosimi A. et al., 1981; Haynes B.F. et al., 1982; Clark E.A. et al., 1983; Letvin N.L. et al., 1983; Neubauer R. et al., 1983; Schooley R.T. et al., 1983; Murayama Y. et al., 1986; Sandusky G.E. et al., 1986; Yuishi M. et al., 1986; Ormerod L.D. et al., 1988; Чепнян Е.Р., 1996). Благодаря этим работам появилась возможность использовать МкАТ к рецепторам МКПК человека для оценки популяции лимфоцитов у обезьян (Letvin N.L., 1986; Инджия Л.В. и соавт., 1987; Serrano A.E. et al., 1987; Terao G.K., 1987; Biagini R.A., 1988; Terao G.K. et al., 1988; Ahmed-Ansari A. et al., 1989; Yamada Y. et al., 1989; Чепнян Е.Р., 1996) и получить более точные данные по количественному содержанию МКПК последних. Также были получены МкАТ и против разных мембранных антигенных структур лейкоцитов макака (Murayama Y. et al., 1989).

иммунологические параметры (на проточном цитофлуориметре):

- Т-клетки (CD3+CD19-)
- Т-хелперы (CD3+CD4+CD8-)
- Т- цитотоксические (CD3+ CD8+CD4-)
- В-лимфоцитов(CD19+CD3-)
- NK-клеток(CD16+CD56+CD3-)
- Фагоцитарная активность НГ (поглотительная и переваривающая)
- Общие иммуноглобулины класса IgM
- Общие иммуноглобулины класса IgG
- Общие иммуноглобулины класса IgA

Исследование разных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови у обезьян выявило гомологичные человеку иммуноглобулины классов M, G, A, E, D (Neoh S.H. et al., 1973; Schur P.H. et al., 1975). В связи с этим, стало возможным использовать моноклональные антитела к иммуноглобулинам человека в исследовании антителопродукции у обезьян (Размадзе Н.Е., Клоц И.Н, 1987).

Несмотря на известную перекрестную реактивность (кросс-реактивность), использование тест-систем для определения человеческих антител применительно к обезьянам не всегда корректно, особенно при определении иммуноглобулинов (антител) вырабатываемых у обезьян к различным возбудителям. Например, в методе ИФА, для получения достоверного результата, целесообразно применять конъюгат с специфическими к обезьяньим иммуноглобулинам антителами .

Постаналитический этап

- * запись результатов
- * статистическая обработка
- * интерпретация результатов
- * формирование отчетов
- * формирование заключения

Заключение

В каждом испытательном центре, параллельно с общеизвестными утверждёнными нормативными документами, регламентирующими порядок проведения доклинических исследований эффективности и безопасности вакцинных препаратов, необходимо составлять и применять внутренние нормативные документы в соответствии с индивидуальными особенностями исследования и спецификой конкретного эксперимента.

Спасибо за внимание!

