

Лёдов

Владимир Алексеевич

**ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО
ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *SHIGELLA FLEXNERI* 2A И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В
КАЧЕСТВЕ ШИГЕЛЛЁЗНОЙ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ**

03.03.03 – иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва

2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства.

Научный
руководитель: Апарин Пётр Геннадьевич,
доктор медицинских наук

Официальные
оппоненты: Топтыгина Анна Павловна,
доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории цитокинов ФБУН «Московский
научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека;

Шмаров Максим Михайлович,
доктор биологических наук, руководитель лаборатории
молекулярной биотехнологии ФГБУ «Федеральный
Научно-исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почетного академика
Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения
Российской Федерации Минздрава России.

Ведущая
организация: ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
Сибирского отделения РАМН.

Защита диссертации состоится «__»_____ г. в ____ ч на заседании совета по
защите докторских и кандидатских диссертаций Д 208.017.01 в ФГБУ «ГНЦ
Институт иммунологии» ФМБА России по адресу: 115478 Москва, Каширское
шоссе, д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт
иммунологии» ФМБА России и на сайте <http://nrcii.ru/dissertacionnyj-sovet>.

Автореферат разослан «__»_____20 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Гудима Георгий Олегович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Дизентерия является одной из самых распространенных острых кишечных инфекций. Ежегодно в мире регистрируется 164,7 млн. случаев заболевания (K.L. Kotloff et al., 1999).

В Российской Федерации наиболее эпидемически значимым возбудителем дизентерии является *S. flexneri* серогруппы 2a (А.Я. Миндлина и соавт., 2010).

В связи с появлением и широким распространением полирезистентных к антибиотикам штаммов шигелл, внедрение системы вакцинопрофилактики дизентерии приобретает особую актуальность (С.А. Егорова и соавт., 2006; А.Я. Миндлина и соавт., 2010). Однако живые и химические вакцины против *S. flexneri* 2a оказались недостаточно эффективными. Коммерческого вакцинного препарата против дизентерии Флекснера не разработано. Разработка такого препарата на основе современных технологических решений является актуальной задачей иммунопрофилактики, которая определена среди приоритетных направлений Всемирной Организации Здравоохранения (Всемирная организация здравоохранения, 2001).

Цель исследования

Доказать возможность применения модифицированного липополисахарида *S. flexneri* 2a в качестве кандидатной вакцины против дизентерии Флекснера.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние длины цепи О-полисахарида и количества остатков высших жирных кислот в липиде А нативного и модифицированного липополисахарида *S. flexneri* 2a на пирогенную реакцию и гуморальный иммунный ответ у экспериментальных животных.

2. Определить наиболее иммуногенный апирогенный вариант модифицированного липополисахарида *S. flexneri* 2a для включения в кандидатную вакцину против дизентерии Флекснера и провести его развернутое иммунологическое исследование.

3. Исследовать механизмы иммунной защиты на слизистых и перекрестную серологическую активность иммуногенного апирогенного модифицированного липополисахарида *S. flexneri* 2a.

4. Провести I фазу клинических исследований кандидатной вакцины «Флексвак» на основе модифицированного липополисахарида *S. flexneri* 2a.

Научная новизна работы

Разработаны фундаментальные основы иммунопрофилактики дизентерии Флекснера, заключающиеся в доказательстве возможности активации адаптивного мукозального иммунного ответа при парентеральном введении модифицированных липополисахаридов.

Выявлены механизмы иммунологического распознавания модифицированных липополисахаридов. Показано, что увеличение длины цепи O-полисахарида повышает иммуногенность, а уменьшение количества остатков жирных кислот в липиде A до двух снижает иммуногенность липополисахарида *S. flexneri* 2a. Установлено формирование иммунной памяти в ответ на введение различных структурных вариантов модифицированных липополисахаридов.

Доказано, что апирогенный и иммуногенный липополисахарид *S. flexneri* 2a включает триацильный липид A и длинноцепной O-полисахарид.

Установлены особенности формирования иммунной защиты от инфицирования вирулентным штаммом *S. flexneri* 2a при иммунизации триацильным длинноцепным модифицированным липополисахаридом.

Проведена I фаза клинических испытаний кандидатной вакцины «Флексвак». Впервые в клинических исследованиях доказана безопасность, хорошая переносимость и выраженная иммуногенность кандидатной вакцины «Флексвак», на основе модифицированного липополисахарида *S. flexneri* 2a.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы обоснована тем, что доказаны положения, вносящие значительный вклад в понимание молекулярных механизмов активации мукозального иммунитета с применением модифицированных апирогенных липополисахаридов *S. flexneri* 2a. Изложены доказательства возможности

модификации липополисахарида с сохранением его иммуногенности и достижением апиrogenности. Изучено и установлено, что увеличение количества остатков жирных кислот в липиде А и/или длины цепи О-полисахарида *S. flexneri* 2a повышает способность к индукции адаптивного иммунного ответа. Раскрыта неизвестная ранее проблема появления иммуносупрессирующего эффекта модифицированного липополисахарида *S. flexneri* 2a при увеличении содержания в препарате фракции диацильных производных. Проведена модернизация экспериментальной модели для определения протективной активности препарата при кератоконъюнктивальном заражении животных *S. flexneri* 2a, заключающаяся в использовании парентерального способа иммунизации.

Основным имеющим значением для практики результатом работы является создание нового вакцинного препарата против дизентерии Флекснера 2a «Флексвак». Активным веществом препарата является модифицированный липополисахарид *S. flexneri* 2a. Разработаны предложения по использованию парентерального введения как эффективного способа применения липополисахаридных дизентерийных вакцин. Результаты изучения безопасности препарата для парентерального введения «Флексвак» в I фазе клинических исследований с участием здоровых добровольцев свидетельствуют о хорошей переносимости, низкой реактогенности кандидатной вакцины при использовании выбранных доз. Определены перспективы клинического применения кандидатной вакцины «Флексвак» для профилактики дизентерии в группах риска.

Создан проект фармацевтической статьи предприятия для кандидатной вакцины против дизентерии Флекснера 2a «Флексвак».

Представлены рекомендации по получению липополисахаридов в качестве основы для создания вакцин.

Полученные данные могут быть использованы в образовательном процессе медицинских и биологических высших учебных заведений, а также в системе последипломного образования.

Апробация результатов работы

Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на X международном конгрессе «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии» (20-23 мая 2009г., Казань), итоговой конференции по результатам выполнения мероприятий за 2009г. в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (25-27 ноября 2009г., Москва), международном симпозиуме «5th Baltic meeting on microbial carbohydrates» (2-6 сентября 2012г., Суздаль), международной конференции «Vaccines for enteric diseases» (6-8 ноября 2013г., Бангкок, Таиланд), 18 европейском симпозиуме «Eurocarb18th» (2-6 августа 2015г., Москва).

Публикации

Соискатель имеет 15 опубликованных работ, все по теме диссертации, общим объёмом 42 страницы, в том числе 5 работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, включённых в перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук («Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии», «Санитарный врач», «FEMS immunology and medical microbiology», «Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук», «Иммунология»), 1 патент и 9 работ в публикациях материалов конгрессов и конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 131 странице машинописного текста, содержит 22 таблицы, 24 рисунка. Диссертация включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение, выводы, список литературы. Список литературы включает 171 источник, в том числе 23 отечественных и 148 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения нативных и модифицированных липополисахаридов (нЛПС, мЛПС) был использован штамм *S. flexneri* 2a 1605. Была разработана питательная среда, предназначенная для повышения выхода биомассы вакцинного штамма *Shigella flexneri* 2a 1605 и эффективного выделения ЛПС.

Для характеристики структуры нЛПС *S. flexneri* 2a и его производных был установлен состав липидов А в опытных образцах с использованием метода масс-спектрометрии и О-полисахарида (О-ПС) с использованием электрофореза в полиакриламидном геле.

Серологическую специфичность образцов установили методом непрямого твёрдофазного иммуноферментного анализа (нТИФА) с использованием коммерческих гомологичных (3,4; II; 1-5) и гетерологичных (7,8; I) сывороток.

Пирогенный тест ставили на кроликах. Образцы разводили 0,9 % апиrogenным раствором натрия хлорида до концентрации 25 нг/мл. Вводили внутривенно 1 мл раствора образца на 1 кг массы животного. Образцы признавали апиrogenными, если суммарное изменение температуры у 3 кроликов после инъекции не превышало 1,2 °С и ни у одного из кроликов не было повышения температуры больше 0,5 °С.

Для исследования гуморального иммунного ответа у мышей (СВАхС57В1/6)F1 на нЛПС и мЛПС *S. flexneri* 2a была проведена внутрибрюшинная иммунизация с последующим определением ЛПС-специфических сывороточных IgG и IgM методом нТИФА и агглютининов в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) с диагностикумом против шигелл Флекснера 1-5.

Антитела (Ат) на слизистых определяли у мышей, иммунизированных интраназально 3,4-ад д/ц мЛПС, с последующим определением ЛПС-специфических IgA, IgG и IgM в бронхолёгочном лаваже методом нТИФА.

Для оценки протективных свойств опытных образцов была разработана экспериментальная модель кератоконъюнктивального заражения, которая является модифицированным тестом Sereny (B. Sereny, 1957) для инфекции *S. flexneri* 2a. Иммунизация морских свинок осуществлялась дозами 25 мкг и 50 мкг подкожно в область спины двукратно с интервалом в 10 дней. На 10 день после повторной иммунизации проводили заражение в конъюнктиву глаза вирулентным штаммом *S. flexneri* 2a 1605 дозами, соответствующими ИД₅₀ и ИД₁₀₀. Иммуногенность препарата оценивали на третьи сутки по количеству здоровых глаз.

Для определения перекрёстной активности Ат мышей, иммунизированных образцом 3,4-ац д/ц мЛПС, была проведена оценка бактериолитических свойств мышинных сывороток по отношению к культурам гомологичной серогруппы *S. flexneri 2a*, гетерологичных серогрупп *S. flexneri 1a, 1b, 2b, 3a, 4a, 5a, 5b* и серотипов *S. flexneri X* и *Y*.

Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития было разрешено проведение I фазы клинических исследований кандидатной вакцины против дизентерии Флекснера 2а – «Флексвак» (разрешение № 04-16507/09 от 2009 года). Исследование проводилось как открытое на базе Федерального государственного учреждения здравоохранения «Центральная медико-санитарная часть №8 Федерального медико-биологического агентства», Калужская область, г. Обнинск.

Целью проведения I фазы клинического исследования было изучение безопасности и иммуногенности кандидатной вакцины «Флексвак» на ограниченном контингенте добровольцев.

В исследовании были поставлены следующие задачи:

- выявить местные и общие реакции на подкожное введение кандидатной вакцины «Флексвак»,
- оценить продукцию специфического гуморального иммунного ответа на введение кандидатной вакцины «Флексвак»,

Было проведено простое слепое неконтролируемое рандомизированное исследование реактогенности и иммуногенности дизентерийной кандидатной вакцины против шигелл Флекснера «Флексвак», I фаза. Всего в исследовании приняли участие 26 добровольцев от 18 до 55 лет, подошедшие под критерии включения, которые были распределены по 3 группам независимо от возраста и пола. Добровольцы в каждой группе были иммунизированы одной из трёх исследуемых доз (25 мкг, 50 мкг и 100 мкг) препарата «Флексвак» однократно подкожно в верхнюю треть плеча.

Параметрами оценки безопасности кандидатной вакцины «Флексвак» являлось определение нежелательных явлений (НЯ), в том числе серьёзных нежелательных явлений (СНЯ). НЯ оценивали как общие и местные реакции организма. СНЯ включают в себя НЯ, которые привели к смерти; представляют собой угрозу для

жизни; требуют госпитализации или её продления; привели к стойкой или значительной нетрудоспособности или инвалидности.

Иммуногенность оценивали как увеличение концентрации О-специфических Ат к ЛПС *S. flexneri* 2a. Уровни Ат определяли путём постановки РПГА и нТИФА с использованием парных порций сывороток добровольцев, полученных от всех привитых до иммунизации через 30 и через 60 дней после иммунизации.

Также, был проведён анализ формирования популяционного иммунитета к ЛПС *S. flexneri* 2a в группах добровольцев, иммунизированных препаратом «Флексвак». Для этого было проанализировано количество добровольцев с приобретённой 2-кратной и 4-кратной сероконверсией специфических Ат.

Для математической обработки полученных данных использовалась программа Excel («Microsoft»). Результаты в работе были представлены как среднегеометрический показатель выборки. Для оценки вариабельности использовалось стандартное отклонение. Сравнение данных выборок осуществлялось с помощью t - критерия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

ЛПС *S. flexneri* 2a является одной из наиболее гетерогенных по структуре биомолекул. Разнообразие структурных вариантов ЛПС *S. flexneri* 2a выражается в различном количестве остатков жирных кислот - ацилов (ац) в липиде А, наличием или отсутствием ацетильной группы на цепи О-ПС в положении 3,4 и в различной длине О-ПС (рис. 1).

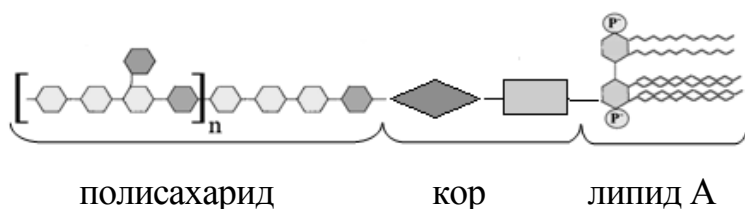


Рис.1. Схема строения ЛПС *S. flexneri* 2a.

В соответствии с данными структурных характеристик ЛПС *S. flexneri* 2a была сформирована исследовательская панель для последующих иммунологических исследований (табл. 1).

Табл. 1. Структурные варианты ЛПС *S. flexneri* 2a.

Полное название образца	Сокращённое название образца	Количество остатков жирных кислот в липиде А	Длина цепи О-ПС (количество тетрасахаридных блоков)	Ацетильная группа в положении 3,4
3-6-ацильный длинноцепной + короткоцепной нЛПС	3-6-ац-д/ц+к/ц нЛПС	3-6	1-15	+
3-6-ацильный длинноцепной нЛПС	3-6-ац д/ц нЛПС	3-6	10-15	+
3-6-ацильный короткоцепной нЛПС	3-6-ац к/ц нЛПС	3-6	1-7	+
4,3-ацильный длинноцепной мЛПС	4,3-ац д/ц мЛПС	4,3	10-15	-
3,4-ацильный короткоцепной мЛПС	3,4-ац к/ц мЛПС	3,4	1-7	-
3,4-ацильный длинноцепной мЛПС	3,4-ац д/ц мЛПС	3,4	10-15	-
3,4-ацильный длинноцепной нЛПС	3,4-ац д/ц нЛПС	3,4	10-15	+
3-ацильный длинноцепной мЛПС	3-ац д/ц мЛПС	3	10-15	-
2,3-ацильный длинноцепной мЛПС	2,3-ац д/ц мЛПС	2,3	10-15	-
Длинноцепной ПС	д/ц ПС	-	10-15	-

Для исследования **специфической активности** мЛПС и нЛПС *S. flexneri* 2a были использованы коммерческие сыворотки, содержащие моновалентные гомологичные Ат к группоспецифическому - 3,4 и типоспецифическому - II антигену ЛПС *S. flexneri* 2a. Также, в исследование были включены: моновалентные гетерологичные сыворотки (группоспецифическая - 7,8 специфичная к ЛПС *S. flexneri* 2b, 3a, 5b, X и типоспецифическая - I сыворотка специфичная к ЛПС *S. flexneri* 1a и 1b) и, часто используемая в клинической практике, поливалентная *S. flexneri* 1 - 5 диагностическая сыворотка.

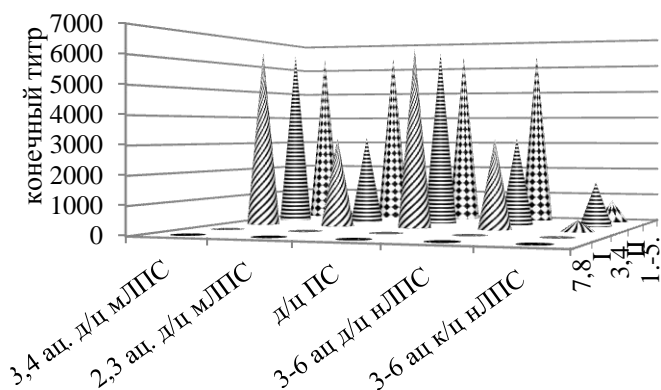


Рис.2. Влияние особенностей строения ЛПС *S. flexneri* 2a на его серологическую специфичность.

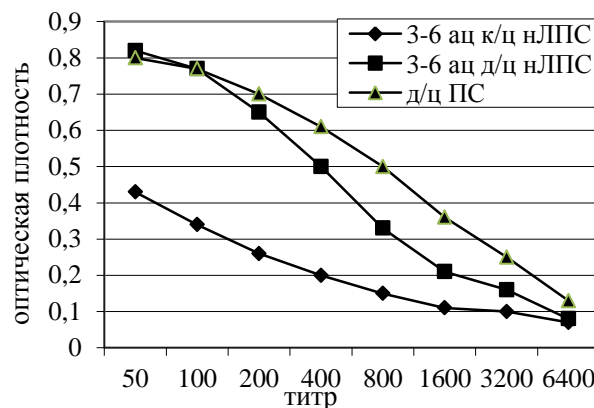


Рис.3. Взаимодействие 3-6-ац к/ц ЛПС, 3-6-ац д/ц ЛПС и д/ц ПС с моновалентной типоспецифической сывороткой II.

Длинноцепные мЛПС (3,4-ац д/ц мЛПС, 2,3-ац д/ц мЛПС), а также д/ц ПС активно связывают Ат гомологичных моновалентных сывороток 3,4; II и поливалентной сыворотки 1 - 5 с конечным титром ≥ 3200 , что сравнимо с активностью длинноцепного нативного ЛПС – 3-6-ац д/ц нЛПС. Следовательно, применяемые методы химической модификации ЛПС *S. flexneri* 2a не повреждают антигенные детерминанты О-ПС *S. flexneri* 2a и они доступны для Ат (рис. 2).

Серологическая активность д/ц ПС и д/ц ЛПС, нативного или модифицированного, также существенно не отличается. То есть, присутствие в молекуле ЛПС липида А не оказывает существенного влияния на специфическую активность длинных цепей О-ПС *S. flexneri* 2a. Кроме того структурная модификация липида А – частичное удаление остатков высших жирных кислот, не приводит к изменению серологической активности д/ц мЛПС *S. flexneri* 2a.

Однако серологическая активность короткоцепного нЛПС была существенно ниже по сравнению с длинноцепными нЛПС и ПС (рис. 2 и 3), что, по-видимому, обусловлено существенно более низким удельным содержанием О-Аг детерминант в образце 3-6-ац к/ц нЛПС.

Следует отметить, что в нЛПС *S. flexneri* 2a в положении 3 и 4 примерно в 60% и 25% случаев, соответственно, находится О-ацетильная группа (Perrepelov, A.V. et al, 2009; Perrepelov, A.V. et al, 2012). Методы химической модификации, способные изменить жирнокислотный состав липида А, одновременно приводят к её удалению. Вместе с тем, отсутствие О-ацетата в положении 3,4 не приводит к потере способности ЛПС *S. flexneri* 2a связывать гомологичные Ат из диагностических сывороток II, 3,4 и 1-5.

Все полученные образцы вне зависимости от длины цепи О-ПС, наличия или отсутствия липида А, количества остатков жирных кислот в липиде А, а также наличия или отсутствия О-ацетильной группы связывают Ат сывороток 3,4, II и 1-5 и не реагируют с сыворотками 7,8 и I (рис. 2). Таким образом, представленные образцы обладают О-Аг специфичностью, характерной именно для ЛПС *S. flexneri* 2a.

Установлены закономерности между строением и составом ЛПС, входящих в различные опытные образцы, и степенью эндотоксичности, оцененной по **пирогенной реакции** кроликов (табл. 2).

Табл. 2. Сравнительное исследование пирогенности образцов нЛПС и мЛПС *S. flexneri* 2a.

Образец	Изменение температуры у кроликов после инъекции (Δt °C)	Суммарное изменение температуры у кроликов после инъекции ($\sum \Delta t$ °C)	Количество кроликов с Δt больше 0,5 °C ($\Delta t > 0,5$ °C)
3-6-ац д/ц+к/ц нЛПС	+1,6; +1,5; +1,1	+4,2	3
3-6-ац д/ц нЛПС	+1,7; +1,5	+3,2	2
3-6-ац к/ц нЛПС	+1,5; +1,7; +1,7	+4,9	3
4,3-ац д/ц мЛПС	+0,3; +1,0; +0,2	+1,5	1
3,4-ац к/ц мЛПС	+0,4; +0,6; +0,4	+1,4	1
3,4-ац д/ц мЛПС	-0,4; -0,2	-0,6	0
3,4-ац д/ц нЛПС	+0,3; +0,3; +0,3	+0,9	0
3-ац д/ц мЛПС	+0,5; +0,2	+0,7	0
2,3-ац д/ц мЛПС	+0,2; +0,3; +0,2	+0,7	0

Исследуемые образцы можно разделить на 3 группы: пирогенные - $\sum \Delta t \geq 3$ °C; низкопирогенные - $1,2$ °C < $\sum \Delta t < 3$ °C и апирогенные - $\sum \Delta t \leq 1,2$ °C (табл. 2). Апирогенные образцы оценивались в соответствии со стандартом Фармакопеи РФ, где вещества признают апирогенными, если суммарное изменение температуры у 3 кроликов после инъекции не превышает 1,2 °C и ни у одного из кроликов не было обнаружено повышения температуры больше 0,5 °C (Государственная фармакопея РФ XII, 2008).

Разделение опытных образцов на 3 группы позволяет выявить переходные структурные закономерности, отличающие низкопирогенные образцы, как от пирогенных, так и от апирогенных образцов.

В группу пирогенных были включены образцы ЛПС *S. flexneri* 2a с неизменённым липидом А: 3-6-ац д/ц+к/ц нЛПС, 3-6-ац д/ц нЛПС, 3-6-ац к/ц нЛПС.

Низкопирогенными оказались ЛПС, содержащие 4,3-ац д/ц мЛПС, 3,4-ац к/ц мЛПС.

Главным отличием пирогенных от низкопирогенных образцов является наличие в составе пирогенных образцов пента- и гексаацильных производных ЛПС *S. flexneri* 2a. Варьирование длины О-ПС, в данном случае, не влияет на степень пирогенной реакции, т.к. пирогенными являются и длинноцепной (3-6-ац д/ц нЛПС), и короткоцепной (3-6-ац к/ц нЛПС) образцы с одинаковыми липидами А.

В группу апиrogenных были включены следующие образцы: 3,4-ац д/ц мЛПС, 3,4-ац д/ц нЛПС, 3-ац д/ц мЛПС, 2,3-ац д/ц мЛПС.

Апиrogenные образцы могут содержать ди-, три- и тетраацильные производные ЛПС *S. flexneri* 2a, так же как и низкопирогенные. Однако для апиrogenных образцов присутствие тетраацильных производных допустимо в минимальных количествах и только в составе длинноцепных фракций ЛПС. Так, образцы 3,4-ац д/ц мЛПС и 3,4-ац к/ц мЛПС содержат примерно одинаковое соотношение три- и тетраацильных ЛПС *S. flexneri* 2a в их составе, однако длинноцепной образец апиrogenен для кроликов, а короткоцепной мЛПС может быть отнесён только к группе низкопирогенных ЛПС *S. flexneri* 2a ($\sum \Delta t = 1,4^\circ\text{C}$).

Таким образом установлено, что способность к индукции пирогенной реакции у кроликов различными структурными вариантами ЛПС *S. flexneri* 2a определяется, главным образом, степенью ацилирования липида А и, в меньшей степени, зависит от длины цепи О-ПС.

Продукция *S. flexneri* 2a ЛПС-специфических сывороточных антител была исследована у мышей, иммунизированных препаратами д/ц, к/ц нЛПС с различной длиной цепи О-ПС или смесью д/ц+к/ц нЛПС (рис. 4). Образцы нЛПС *S. flexneri* 2a содержали неизменённый 3-6-ацильный, липид А и поэтому являлись классическими эндотоксинами. Внутривенное введение кроликам данных образцов приводило к возникновению сильной пирогенной реакции (табл. 2).

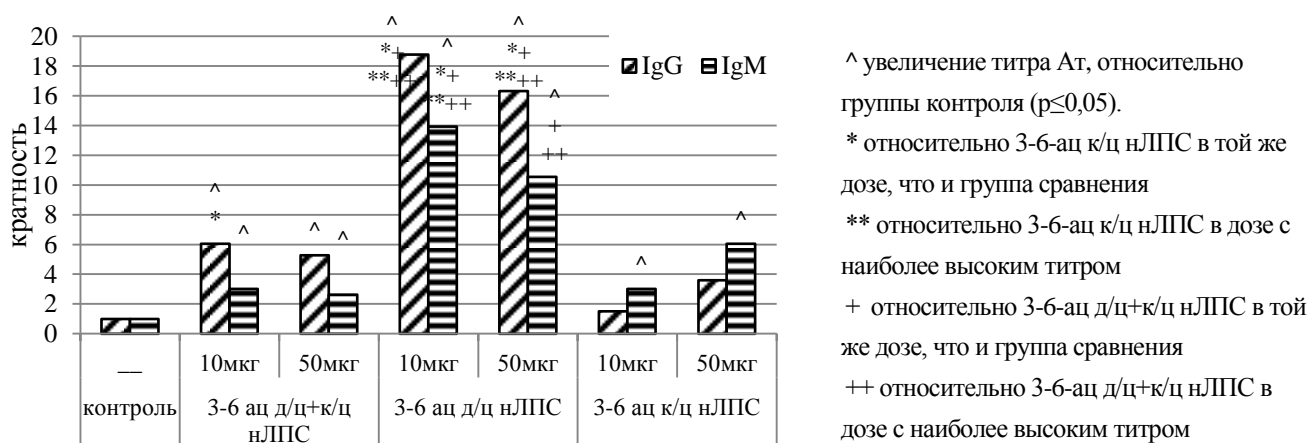


Рис. 4. Кратность прироста титра Ат в сыворотках мышей, иммунизированных 3-6-ац нЛПС, отличающихся по длине цепи О-ПС.

Кратность прироста конечного титра анти-ЛПС IgG в группах мышей, иммунизированных 3-6-ац к/ц нЛПС в дозах 10 и 50 мкг, составила 1,52 и 3,59 соответственно, а IgM - 3,03 и 6,06, соответственно. Достоверное увеличение титра относительно показателя контрольной группы было зарегистрировано для IgM в обеих опытных группах (рис. 4).

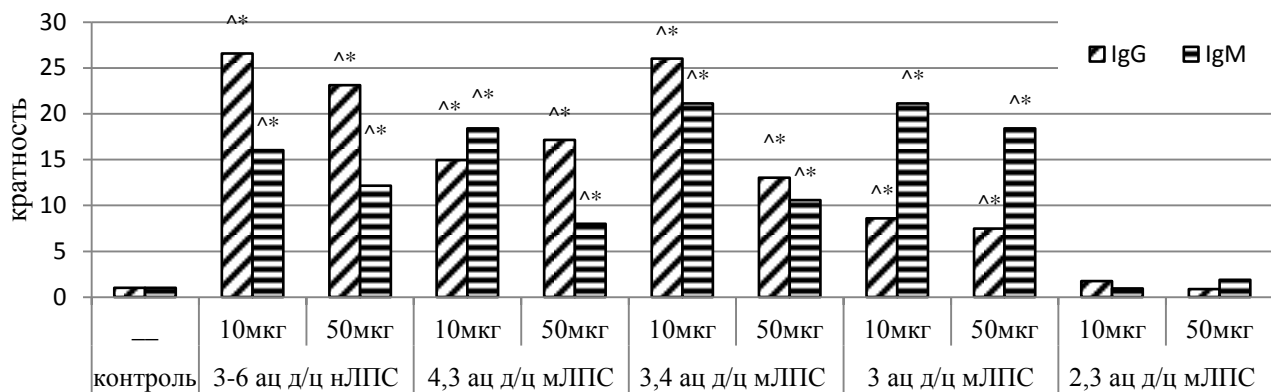
В группах мышей, иммунизированных 10 мкг и 50 мкг образца 3-6-ац д/ц нЛПС, кратность прироста Ат статистически достоверно выше, чем в контрольной группе, и составила для IgG 18,77 и 16,33, соответственно, и для IgM – 13,93 и 10,56, соответственно.

В группе мышей, иммунизированной 10 мкг образца 3-6-ац д/ц нЛПС, IgG и IgM достоверно выше, чем в группах мышей, иммунизированных аналогичными дозами образцов 3-6-ац д/ц+к/ц нЛПС и 3-6-ац к/ц нЛПС. Более того, в данной группе IgG и IgM достоверно выше, чем наиболее высокие титры Ат в группах, иммунизированных 3-6-ац д/ц+к/ц нЛПС и 3-6-ац к/ц нЛПС.

В группе, иммунизированной 50 мкг образца 3-6-ац д/ц нЛПС, IgG достоверно выше, чем в группах, иммунизированных такими же дозами образцов 3-6-ац д/ц+к/ц нЛПС и 3-6-ац к/ц нЛПС, а также, чем наиболее результативные показатели титров IgG в этих группах. Показатель IgM в группе, иммунизированной 50 мкг образца 3-6-ац д/ц нЛПС, достоверно выше ($p \leq 0,05$), чем в группе, иммунизированной 3-6-ац д/ц+к/ц нЛПС.

В связи с более высоким уровнем продукции Ат у мышей на ЛПС *S. flexneri 2a* с длинной цепью О-ПС, особое внимание было уделено **изучению иммуногенности структурных вариантов длинноцепного ЛПС *S. flexneri 2a* с разным составом липида А** (табл. 1 б, г, е, з, и). Было установлено, что исследуемые образцы отличались по степени пирогенности на кроликах. Так, образец 3-6-ац д/ц нЛПС – пирогенен, образец 4,3-ац д/ц мЛПС – низкопирогенен и образцы: 3,4-ац д/ц мЛПС, 3-ац д/ц мЛПС, 2,3-ац д/ц мЛПС – апиогенны (табл. 2).

Для сравнения иммуногенности были определены титры IgG и IgM у мышей опытных групп, иммунизированных исследуемыми образцами в дозах 10 мкг и 50 мкг, и у контрольной группы интактных мышей (рис. 5).



[^] - статистически достоверное увеличение титра относительно группы контроля ($p \leq 0,05$).

* - относительно группы иммунизированной 2,3-ац д/ц мЛПС в той же дозе, что и группа сравнения

Рис. 5. Кратность прироста титра Ат в сыворотках мышей, иммунизированных д/ц нЛПС, с различными липидами А.

Как представлено на рис. 5, титры IgG и IgM в сыворотках мышей, иммунизированных 2,3-ац д/ц нЛПС, практически не отличаются от контрольных значений.

Титры IgG и IgM в группах мышей, иммунизированных образцами 3-6-ац д/ц нЛПС, 4,3-ац д/ц мЛПС, 3,4-ац д/ц мЛПС, 3-ац д/ц мЛПС, были статистически достоверно выше, чем у мышей, иммунизированных 2,3-ац д/ц мЛПС, и чем в контрольной группе, независимо от дозы иммунизации ($p \leq 0,05$).

Результаты эксперимента свидетельствуют, о том, что иммуногенность ЛПС *S. flexneri 2a* достоверно снижается с присутствием в составе опытного образца существенного количества 2-ацильного производного ЛПС. Между тем, опытные образцы, содержащие преимущественно 3-, 4-, 5- и 6-ацильные производные ЛПС *S. flexneri 2a*, индуцировали высокие уровни ЛПС-специфических IgG и IgM у мышей.

Таким образом, суммируя данные по пирогенности и результаты исследования иммуногенности панели ЛПС *S. flexneri 2a*, можно сделать вывод, что в качестве препарата выбора для создания шигеллёзной вакцины может рассматриваться образец, содержащий в качестве доминирующей фракции длинноцепные 3-ацильные мЛПС.

Для характеристики системного и местного иммунного ответа на иммунизацию 3,4-ац д/ц мЛПС мышей (СВАхС57В1/6)F1, были изучены титры и профиль Ат в сыворотке крови и на поверхности слизистой лёгких.

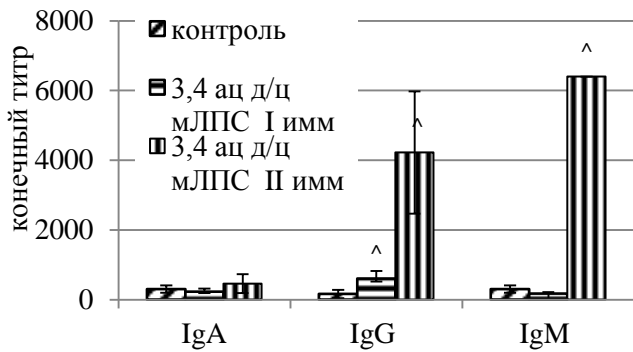


Рис. 6. Конечные титры IgA, IgG, IgM в сыворотках мышей после однократной и двукратной иммунизации 3,4-ац д/ц мЛПС.



Рис. 7. Кратность прироста конечных титров субклассов IgG в группах мышей, иммунизированных 3,4-ац д/ц мЛПС.

Гуморальный иммунный ответ на слабоацилированный 3,4-ац д/ц мЛПС образец у мышей характеризовался сильной индукцией IgG, IgM, преимущественно, после повторной иммунизации (рис. 6). Повышение титров сывороточных IgG и IgM ($p \leq 0,05$) у мышей составило $4222,4 \pm 1752,7$ и $6400,0 \pm 0$, соответственно (титры IgG и IgM в контрольной группе $162,5 \pm 121,2$ и $303,1 \pm 103,3$, соответственно).

Однократная иммунизации образцом 3,4-ац д/ц мЛПС приводила к достоверному повышению IgG в сыворотках мышей до $606,3 \pm 219,1$ (титр IgG в контрольной группе $162,5 \pm 121,2$).

Для полного понимания профиля гуморального иммунного ответа к 3,4-ац д/ц мЛПС было проведено исследование субклассов сывороточных IgG (рис. 7). При двукратной иммунизации образцом 3,4-ац д/ц мЛПС в дозе 2,5 мкг как при внутрибрюшинном, так и при подкожном способе введения, в сыворотках мышей доминируют Ат субкласса IgG₃. Кратность прироста IgG₃ относительно показателей контрольной группы составила 12,7 независимо от способа введения образца.

С целью оценки гуморального ответа на слизистых, особенно важного для формирования иммунитета против шигелл, были определены мукозальные IgA, IgG, IgM в лёгочном лаваже мышей, иммунизированных двукратно интраназально образцом 3,4-ац д/ц мЛПС дозой 50 мкг (рис. 8).

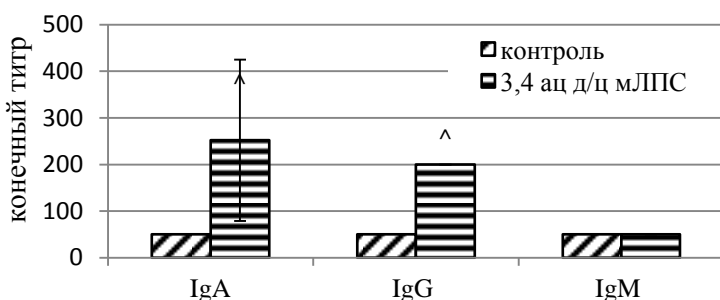


Рис. 8. Конечные титры Ат в бронхолёгочном лаваже у мышей, иммунизированных 3,4-ац д/ц мЛПС.

Как показано на рис. 8 титры мукозальных IgA и IgG у мышей, иммунизированных образцом 3,4-ац д/ц мЛПС, были выше, по сравнению с Ат в контрольной группе, и составили 252,0 и 200,0, соответственно. Титры IgA и IgG в контрольной группе не превышали 50. Уровень IgM в бронхолегочном лаваже иммунизированных мышей и мышей контрольной группы не отличался.

Таким образом, исследование профиля адаптивного гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных образцом 3,4-ац д/ц мЛПС показало, что системный иммунный ответ мышей представлен в основном IgM и IgG. Среди сывороточных IgG доминирует субкласс IgG₃. Также, исследование мукозального гуморального иммунного ответа продемонстрировало возможность его индукции у мышей при интраназальной иммунизации образцом 3,4-ац д/ц мЛПС.

Для исследования протективной активности ЛПС *S. flexneri* 2a, была проведена двукратная иммунизация морских свинок подкожно в область спины образцами 3-6-ац д/ц нЛПС и 3,4-ац д/ц мЛПС в дозах 25 мкг и 50 мкг, с последующим заражением в конъюнктиву глаза вирулентным штаммом *S. flexneri* 2a. Предварительные данные показали, что для используемого в исследовании вирулентного штамма *S. flexneri* 2a минимальная ИД₁₀₀ равна 2×10^7 микробных клеток. Отсутствие развития кератоконъюнктивита у иммунизированных морских свинок свидетельствовало о формировании протективного иммунитета.

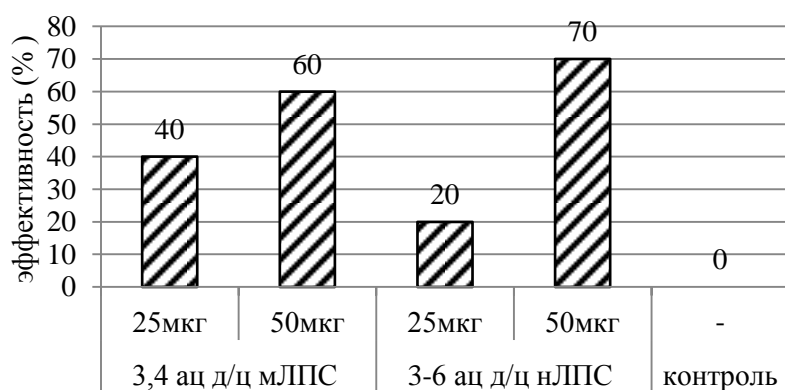


Рис. 9. Сравнительное исследование протективной эффективности мЛПС и нЛПС *S. flexneri* 2a при кератоконъюнктивальном заражении вирулентным штаммом *S. flexneri* 2a.

Как показано на рис. 9, у морских свинок, иммунизированных двукратно образцом 3,4-ац д/ц мЛПС дозами 25 мкг и 50 мкг, эффективность протективного иммунитета составила 40% и 60%, соответственно. А у морских свинок, иммунизированных образцом 3-6-ац д/ц нЛПС дозами 25 мкг и 50 мкг, уровень защиты глаз морских свинок составил 20% и 70%, соответственно. Существенных отличий между показателем протективной эффективности между модифицированным и нативным ЛПС *S. flexneri* 2a не выявлено. Также, для обоих образцов можно отметить

увеличение протективной эффективности при увеличении дозы иммунизации с 25 мкг до 50 мкг.

Для исследования перекрёстной активности антител мышей, иммунизированных образцом 3,4-ац д/ц мЛПС, была проведена оценка бактериолитических свойств мышинных сывороток по отношению к гомологичным и гетерологичным серогруппам и серотипам шигелл Флекснера. Всего в исследовании было использовано 10 серогрупп и серотипов шигелл, среди которых гомологичной была культура клеток серогруппы *S. flexneri* 2a, а гетерологичными - *S. flexneri* 1a, 1b, 2b, 3a, 4a, 5a, 5b, X, Y. В качестве контроля служили сыворотки, взятые от интактных мышей.

Параметром оценки бактериолиза шигелл являлся индекс эффективности (ИЭ), который определяли как отношение числа колоний на контрольных чашках Петри к числу колоний на опытных чашках. Считается, что сыворотка обладает выраженным бактериолитическим эффектом, если её ИЭ больше или равен 2. Средний индекс эффективности по каждой из используемых колоний представлен на рис. 10.

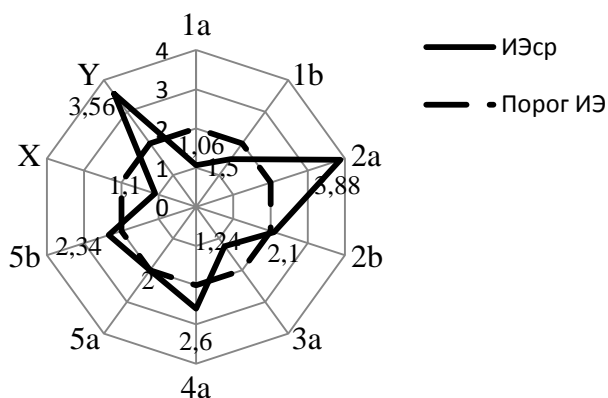


Рис. 10. Сравнительная бактериолитическая активность сывороток мышей, иммунизированных образцом 3,4-ац д/ц мЛПС, в отношении к различным серотипам и серогруппам *S. flexneri*.

Данные, представленные на рис. 10, показывают, что ИЭ сывороток мышей, иммунизированных образцом 3,4-ац д/ц мЛПС, ≤ 2 в отношении серогрупп - 1a, 1b, 3a, 5a и серотипа X. ИЭ ≥ 2 в отношении серогрупп - 2a, 2b, 4a, 5b и серотипа Y.

Таким образом, сыворотки мышей, иммунизированных образцом 3,4-ац д/ц мЛПС, демонстрируют выраженный бактериолитический эффект в отношении шигелл Флекснера гомологичной серогруппы 2a. Наибольшая перекрёстная активность против гетерологичных шигелл Флекснера была выявлена по отношению к серогруппам - 2b, 4a, 5b и серотипу Y.

В 2009 году Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития было разрешено проведение **I фазы клинических**

исследований кандидатной вакцины против дизентерии Флекснера 2а «Флексвак» (разрешение № 04-16507/09). Активным действующим веществом кандидатной вакцины «Флексвак» был 3,4-ац д/ц мЛПС *S. flexneri* 2а.

Для **оценки безопасности** кандидатной вакцины «Флексвак» были определены НЯ, в том числе НЯ не связанные с применением препарата «Флексвак», и СНЯ.

У 2 добровольцев была зарегистрирована гиперемии лёгкой степени интенсивности в месте введения препарата, образовавшаяся в течение 2 часов после инъекции. Болезненности, образования инфильтратов, увеличения регионарных лимфоузлов выявлено не было за весь период наблюдения ни у одного из добровольцев (табл. 3).

Общее самочувствие добровольцев после вакцинации было без изменений. Жалоб на недомогание, головную боль, тошноту, рвоту, понос, боль добровольцы не предъявляли. По данным инструментальных методов исследования отрицательной динамики в структуре общих реакций не выявлено (табл. 3).

Табл. 3. Местные и общие реакции у добровольцев на введение кандидатной вакцины «Флексвак».

Общее количество добровольцев 26 человек.					
Признак	Тип реакции	Проявление реакции	Абсолютный показатель (человек)	Продолжительность	Интенсивность
НЯ	Местные реакции	Болезненность	0	--	--
		Покраснение	2	10 - 20 мин.	лёгкое
		Инфильтраты	0	--	--
		Увеличение регионарных лимфатических узлов	0	--	--
	Общие реакции	$t \geq 37,1^{\circ}C$	0	--	--
		АД $\geq 140/100$ мм.рт.ст.	0	--	--
		ЧСС ≥ 90 уд.мин.	0	--	--
		Тошнота	0	--	--
		Понос	0	--	--
		Рвота	0	--	--
		Головная боль	0	--	--
	Боль в животе	0	--	--	
	СНЯ			0	--

Таким образом, результаты изучения общих и местных постпрививочных реакций свидетельствуют о безопасности, низкой реактогенности и хорошей переносимости кандидатной вакцины «Флексвак» при использовании выбранных доз.

Также следует отметить, что за весь период исследования у добровольцев не было зарегистрировано СНЯ.

Иммуногенность кандидатной вакцины оценивали по разнице концентраций анти-*S. flexneri* 2a O-специфических Ат, определяемых в сыворотках крови добровольцев до вакцинации, на 30 сутки и на 60 сутки после вакцинации кандидатной вакциной «Флексвак».

Результаты исследования в РПГА сывороток крови, привитых дизентерийной кандидатной вакциной, с коммерческим поливалентным диагностикумом *S. flexneri* 1-5 представлены в табл. 4.

Табл. 4. Показатели сероконверсии *S. flexneri* 2a-специфических агглютининов у добровольцев после вакцинации препаратом «Флексвак».

Препарат	Доза (мкг)	Сероконверсия ≥ 2		Сероконверсия ≥ 4	
		30 сутки после вакцинации	60 сутки после вакцинации	30 сутки после вакцинации	60 сутки после вакцинации
Флексвак	25	86%	100%	43%	100%
	50	100%	100%	88%	100%
	100	67%	100%	22%	75%

Данные представленные в табл. 4 показывают, что на 30 сутки после вакцинации препаратом «Флексвак» в дозах 25, 50 и 100 мкг сероконверсия агглютининов ≥ 2 была выявлена у 86%, 100% и 67% добровольцев соответственно; сероконверсия ≥ 4 составила 43%, 88% и 22% соответственно.

На 60 сутки сероконверсия агглютининов ≥ 2 среди добровольцев составила 100%, независимо от используемой дозы иммунизации препаратом «Флексвак». Сероконверсия ≥ 4 при вакцинации дозами 25, 50 и 100 мкг была определена у 100%, 100% и 75% добровольцев соответственно.

Данные приведённые в табл. 5 показывают, что на 30 сутки после иммунизации наиболее высокая частота сероконверсий IgA ≥ 2 была зарегистрирована в группе добровольцев, вакцинированных 50 мкг препарата «Флексвак» и составила 88%.

Сероконверсия $IgA \geq 4$ была зарегистрирована примерно у 40% добровольцев независимо от используемой дозы препарата.

Табл. 5. Показатели сероконверсии ЛПС *S. flexneri* 2a-специфических IgA , IgG , IgM у добровольцев после вакцинации препаратом «Флексвак».

Препарат	Доза (мкг)	30 сутки после вакцинации						60 сутки после вакцинации					
		Титр ≥ 2			Титр ≥ 4			Титр ≥ 2			Титр ≥ 4		
		IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
Флексвак	25	57%	71%	14%	43%	43%	14%	80%	100%	40%	40%	40%	-
	50	88%	75%	50%	38%	75%	25%	100%	100%	50%	50%	75%	25%
	100	56%	78%	22%	44%	22%	-	50%	75%	50%	25%	50%	-

Количество сероконверсий $IgG \geq 2$ было высоким во всех группах иммунизированных и колебалось в пределах от 71% (25 мкг) до 78% (100 мкг). Максимальное количество сероконверсий $IgG \geq 4$ было зарегистрировано в группе добровольцев, иммунизированных дозой 50 мкг, и составило 75%.

Наиболее высокий прирост сероконверсий $IgM \geq 2$ был зарегистрирован среди добровольцев, иммунизированных дозой 50 мкг препарата, и составил 50%. Количество сероконверсий $IgM \geq 4$ также было наибольшим в группе добровольцев, иммунизированных дозой 50 мкг препарата, и составило 25%.

На 60 сутки после иммунизации добровольцев препаратом «Флексвак» сероконверсия Ат исследуемых классов остаётся высокой с сохранением тенденции доминирования IgG , IgA .

Результаты I фазы клинических исследований кандидатной вакцины «Флексвак», содержащей в качестве активного вещества 3,4-ац д/ц мЛПС, показали хорошую переносимость препарата добровольцами. Серьёзные нежелательные явления, общие воспалительные реакции организма человека на подкожное введение препарата отсутствуют, местные - единичны.

В сыворотках добровольцев, иммунизированных кандидатной вакциной «Флексвак», были зафиксированы ЛПС *S. flexneri* 2a-специфические IgG , IgA , которые являются основой защитной реакции организма от развития дизентерии.

Совокупность полученных данных позволяет сделать предположение, что препараты на основе мЛПС *S. flexneri* 2a способны обеспечить защиту взрослых добровольцев от развития дизентерии Флекснера 2a.

Выводы

1. Разработан принципиально новый подход к иммунопрофилактике дизентерии Флекснера, состоящий в одновременной активации мукозального и системного иммунного ответа с помощью парентеральной вакцинации.

2. Разработан оригинальный вакцинный иммуноген – модифицированный ЛПС *S. flexneri* 2a, безопасный для парентерального введения человеку.

3. Модифицированный ЛПС *S. flexneri* 2a, содержащий преимущественно три остатка высших жирных кислот в липиде А и длинноцепной О-полисахарид, является одновременно апиrogenным и иммуногенным.

4. На модели кератоконъюнктивального заражения морских свинок показано, что парентеральная иммунизация апиrogenным модифицированным ЛПС обеспечивает высокий уровень мукозальной защиты от заражения вирулентным штаммом *S. flexneri* 2a, сравнимый по протективному эффекту с введением пирогенного нативного ЛПС.

5. Иммунизация модифицированным ЛПС приводит к увеличению титров специфических IgG, IgM в сыворотках и IgA, IgG на слизистой поверхности лёгких у мышей. Доминирующим субклассом IgG в сыворотках является IgG₃.

6. Установлен бактериолитический эффект сывороточных антител мышей, иммунизированных модифицированным ЛПС *S. flexneri* 2a против шигелл Флекснера гомологичной серогруппы 2a и их существенная перекрёстная активность против гетерологичных серогрупп – 2b, 4a и 5b и серотипа Y.

7. В клинических исследованиях I фазы продемонстрирована безопасность и хорошая переносимость кандидатной вакцины «Флексвак» на основе модифицированного ЛПС *S. flexneri* 2a в сочетании с выраженной иммуногенностью при подкожном введении добровольцам в дозах 25, 50 и 100 мкг. Отчёт принят Министерством здравоохранения Российской Федерации. Обоснованным является включение препарата «Флексвак» во II фазу клинических исследований.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Грищенко, Н.В. Влияние состава питательной среды на продукцию капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 19A [Текст] / Н.В. Грищенко, М.М. Токарская, Н.Г. Калина, С.И. Елкина, О.В. Головинская, Н.Е. Ястребова, В.А. Лёдов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2012. — № 2. — С. 12-17.

2. Лёдов, В.А. К вопросу о разработке вакцины против дизентерии Флекснера [Текст] / В.А. Лёдов, П.Г. Апарин, А.Н. Каира // Санитарный врач. — 2012. — №10. — С. 13 - 20.
3. Perepelov, A.V. *Shigella flexneri* O-antigens revisited: final elucidation of the O-acetylation profiles and a survey of the O-antigen structure diversity [Текст] / A. V. Perepelov, M. E. Shekht, B. Liu, S. D. Shevelev, V. A. Ledov, S. N. Senchenkova // FEMS immunology and medical microbiology. — 2012. — V.66. — No 2. — P. 201 - 210.
4. Лёдов, В.А. Клинические исследования вакцинного препарата для профилактики дизентерии Флекснера на основе модифицированного липополисахарида *Shigella flexneri* (по результатам I фазы клинических исследований) [Текст] / В. А. Лёдов, П.Г. Апарин // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук. — 2014. — №4. — С. 91 - 95.
5. Лёдов, В.А. Иммуногенные и протективные свойства липополисахаридов *Shigella flexneri* 2a с химически модифицированным липидом А [Текст] / В. А. Лёдов, М.Э. Головина, Н.Н. Лучина, В.Л. Львов, П.Г. Апарин // Иммунология. — 2015. — Т.36. — №2. — С. 99 - 104.
6. Пат. 2014196887 WIPO, МПК C07H 13/06, C07H 15/04, C07H 5/06, A61K 31/715, A61K 31/70, A61P 31/04, A61P 37/02. Modified endotoxic bacteria lipopolysaccharide (variants), combination of modified lipopolysaccharide (variants) and, containing same, a vaccine (variants) and a pharmaceutical composition (variants) [Текст] / Aparin, P.G., Lvov, V.L., Elkina, S.I., Golovina, M.E., Ledov, V.A., Markina, A.A., Shekht, M.E.; заявитель и патентообладатель Aparin, P.G., Lvov, V.L., Elkina, S.I. Golovina, M.E. — № PCT/RU2013000456; заявл. 04.06.2013; опубл. 11.12.2014.
7. Лёдов, В.А. Об актуальности разработки вакцины против дизентерии Флекснера [Текст] / В.А. Лёдов, П.Г. Апарин, М.Э. Головина, Н.Н. Лучина, В.Л. Львов // Тезисы всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». — М., 2008. — С. 71.
8. Лёдов, В.А. Исследование иммуногенности и протективной активности низкоэндоксичного липополисахарида *Shigella flexneri* 2a [Текст] / В.А. Лёдов, П.Г. Апарин, М.Э. Головина, В.Л. Львов, М.Е. Шехт // Российский аллергологический журнал. — 2009. — №3. — выпуск 1. — С. 247 - 248.
9. Лёдов, В.А. Изучение влияния структурных особенностей липополисахарида *Shigella flexneri* 2a и его производных на взаимодействие со специфическими антителами [Текст] / В.А. Лёдов, М.Е. Шехт // Российский аллергологический журнал. — 2009. — №3. — выпуск 1. — С. 248 - 249.

10. Апарин, П.Г. Разработка технологий получения комплекса лекарственных препаратов на основе полисахаридных и пептидных конструкций для профилактики, лечения и реабилитации больных дизентериями Флекснера и Зонне и создание опытного производства субстанций и лекарственных форм этих препаратов [Текст] / П.Г. Апарин, В.Л. Львов, М.Э. Головина, И.В. Анкудинов, Н.Н. Лучина, И.К. Вернер, М.Е. Шехт, В.А. Лёдов, В.И. Шмиголь, Н.Ю. Курбатова, И.Г. Суркова // Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 -2012 годы». — М., 2009. — С. 227 - 228.

11. Лёдов, В.А. Иммуногенность новой вакцины против шигелл Флекснера «ФЛЕКСВАК» по результатам I фазы клинических исследований [Текст] / В.А. Лёдов // Тезисы всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». — М., 2010. — С.121.

12. Ledov, V.A. Safety and immunogenicity under volunteer trials of the polyvalent O-antigen *S.flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y vaccine / V.A. Ledov, V.L. L'vov, M.E. Shekht, M.E. Golovina, P.G. Aparin [Текст] // Сборник тезисов 5-й Балтийской конференции по микробным углеводам. — Суздаль, 2012. — Р. 42.

13. Ledov, V.A. Investigation of immunogenicity and safety of combined *Shigella sonnei* & *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate on experimental animals [Текст] / V.A. Ledov, M.E. Shekht // Abstract book «Vaccines for enteric diseases». — Bangkok, 2013. — Р. 124.

14. Лёдов, В.А. Опыт клинического использования апирогенного модифицированного липополисахарида *S.flexneri* 2a по результатам I фазы клинических исследований [Текст] / В.А. Лёдов, В.Л. Львов, М.Е. Шехт, М.Э. Головина, П.Г. Апарин // Труды Международного форума «Клиническая иммунология и аллергология - междисциплинарные проблемы». — Казань, 2014. — С. 130 - 131.

15. Ledov, V. A. Cross-activity of serum antibodies from mice immunized with apyrogenic modified lipopolysaccharide of *Shigella flexneri* 2a to other serogroups and serotypes of *Shigella flexneri* [Текст] / V.A. Ledov, P.G. Aparin // Abstract book «Eurocarb 18». — М., 2015. — 2015. — Р. 56.