

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616-022.7:616-08

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАКЦИННЫЕ КАНДИДАТЫ С ИНТЕГРИРОВАННЫМИ АДЬЮВАНТАМИ КАК СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ ЭФФЕКТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Леонтьева Г. Ф., Крамская Т. А., Грабовская К. Б., Гупалова Т. В.,
Дмитриев А. В., Суворов А. Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт
экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Леонтьева Галина Федоровна,
ФГБНУ «ИЭМ»,
ул. Академика Павлова, д. 12, Санкт-
Петербург, Россия, 197022.
E-mail: galeonte@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 02.10.2022
и принята к печати 23.10.2022.

РЕЗЮМЕ

Применение рекомбинантных белков в качестве вакцинных препаратов ограничивается их слабой иммуногенностью, которую можно усилить за счет использования адьювантов, разработка которых является важной и актуальной проблемой современной вакцинологии. Существенно, что адьюванты в качестве добавок к вакцинным препаратам вызывают озабоченность клиницистов. С этой точки зрения идея включения в структуру молекулы рекомбинантного белка внутреннего адьюванта представляет несомненный интерес.

Ранее нами были синтезированы и изучены два рекомбинантных вакцинных препарата, специфичных в отношении *S. agalactiae* (Su4) и *S. pneumoniae* (PSPF). Каждый из них представлял собой тандем из нескольких иммуногенных участков поверхностных бактериальных белков в сочетании с дополнительным адьювантным участком. В качестве внутреннего адьюванта выступала аминокислотная последовательность, идентичная флагеллину *S. typhimurium*. В настоящей работе мы исследовали возможность дополнительного усиления иммунной реакции организма на иммунизацию рекомбинантными белками Su4 и PSPF за счет одновременного введения внешнего адьюванта — карбоксиметилхитозана или Imject Alum.

Исследования показали, что дополнительное введение указанных адьювантов в состав вакцинного препарата не оказывало влияния на иммуногенность белков Su4 и PSPF, в состав которых входил внутренний адьювант флагеллин. Протективная эффективность иммунного ответа на все варианты иммунизации была сопоставимой.

Таким образом, включение в состав рекомбинантных белков флагеллиновой вставки в качестве внутреннего адъюванта обеспечивает развитие максимально возможного уровня иммунного ответа и его протективную эффективность в отношении соответствующих возбудителей бактериальной инфекции.

Ключевые слова: адъюванты, химерные рекомбинантные белки, хитозан, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*.

Для цитирования: Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Грабовская К.Б., Гупалова Т.В., Дмитриев А.В., Суворов А.Н. Рекомбинантные вакцинные кандидаты с интегрированными адъювантами как способ стимуляции эффективного иммунного ответа против возбудителей бактериальных инфекций. *Российский журнал персонализированной медицины.* 2022;2(6):64-77. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-64-77.

RECOMBINANT VACCINE CANDIDATES WITH INTEGRATED ADJUVANTS PROVIDE STIMULATION OF AN EFFECTIVE IMMUNE RESPONSE AGAINST BACTERIAL INFECTIONS

Leontieva G. F., Kramskaya T. A., Grabovskaya K. B., Gupalova T. V., Dmitriev A. V., Suvorov A. N.

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Leontieva Galina F.,
Institute of Experimental Medicine,
Academician Pavlov str., 12, Saint
Petersburg, Russia, 197022.
E-mail: galeonte@yandex.ru

Received 02 October 2022; accepted
23 October 2022.

ABSTRACT

The use of recombinant proteins as vaccine preparations is limited by their weak immunogenicity, which can be enhanced by the use of adjuvants, the development of which is an important and urgent problem of modern vaccinology. Significantly, adjuvants as additives to vaccine preparations are of concern to clinicians. From this point of view, the idea of including an internal adjuvant into the structure of a recombinant protein molecule is of undoubted interest. Previously, we synthesized and studied two recombinant vaccine preparations specific for *S. agalactiae* (Su4) and *S. pneumoniae* (PSPF). Each of them was a tandem of immunogenic bacterial surface proteins in combination with an additional adjuvant site. The amino acid sequence identical to flagellin acted as an internal adjuvant. In this work, we investigated the possibility of additional enhancement of the body's immune response to immunization with

recombinant Su4 and PSPF proteins due to the simultaneous administration of an external adjuvant, carboxymethylchitosan or Imject Alum.

Studies have shown that the additional introduction of these adjuvants into the composition of the vaccine preparation did not affect the immunogenicity of the Su4 and PSPF proteins, which included the internal adjuvant flagellin. The protective efficacy of the immune response to all immunization options was comparable.

Thus, the inclusion of a flagellin insert as an internal adjuvant into the composition of recombinant proteins ensures the development of the highest possible level of the immune response and its protective efficacy against the corresponding pathogens of a bacterial infection.

Key words: *adjuvants, chimeric recombinant proteins, chitosan, S. agalactiae, S. pneumoniae.*

For citation: Leontieva GF, Kramskaya TA, Grabovskaya KB, Gupalova TV, Dmitriev AV, Suvorov AN. Recombinant vaccine candidates with integrated adjuvants provide stimulation of an effective immune response against bacterial infections. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(6):64-77. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-64-77.

Список сокращений: КМХ — карбоксиметилхитозан, ФФБ — физиологический раствор.

ВВЕДЕНИЕ

Использование рекомбинантных аналогов поверхностных белков патогенных стрептококков в качестве вакцинных препаратов для профилактики стрептококковых инфекций стало предметом многих современных исследований в области иммунопрофилактики [1]. Десятки белков исследованы, получены экспериментальные доказательства их иммуногенности и защитной эффективности иммунного ответа. В последние годы предприняты попытки синтеза химерных рекомбинантных белковых структур, то есть искусственных молекул, имеющих несколько антигенных специфичностей, идентичных различным поверхностным белкам стрептококков [2–5].

Применение рекомбинантных белков в качестве вакцинных препаратов ограничивается их слабой иммуногенностью [6]. Иммунный ответ можно усилить за счет применения адъювантов, выбор которых чрезвычайно велик [7], если речь идет о решении экспериментальных задач, и очень незначителен для использования в практическом здравоохранении [8], поскольку адъюванты, введенные в состав профилактической вакцины, должны давать минимальные побочные реакции, что не всегда соответствует действительности [9]. С этой точки зрения может представлять интерес

идея включения в состав молекулы рекомбинантного белка полипептидных последовательностей, обладающих потенциалом иммуностимуляции. Вакцинный препарат с такими свойствами не требует использования дополнительных адъювантов.

Нами были синтезированы два рекомбинантных вакцинных препарата, специфичных в отношении *S. agalactiae* (Su4) и *S. pneumoniae* (PSPF). Каждый из них представлял собой тандем иммуногенных эпитопов поверхностных бактериальных белков с дополнительным участком, повторяющим аминокислотную последовательность флагеллина [3]. Бактериальный белок флагеллин является лигандом рецептора TLR5, способного распознавать ассоциированные с патогенами молекулярные структуры [10]. Таким образом, флагеллин посредством стимуляции механизмов врожденного иммунитета усиливает адаптивные иммунные реакции.

Иммуногенные свойства обеих химерных рекомбинантных конструкций были изучены ранее [2, 11].

В настоящей работе мы изучили возможность дополнительного усиления иммунной реакции организма на иммунизацию рекомбинантными белками, имеющими внутренний адъювант на основе флагеллина, за счет одновременного добавления внешнего адъюванта — карбоксиметилхитозана или Imject Alum.

Природный биополимер хитозан и ряд его химических производных могут быть интересны

в качестве безопасных и биodeградируемых адъювантов в составе профилактических вакцин для человека и животных. Входящие в состав Imject Alum соли алюминия широко используются в экспериментальной практике.

Исследования показали, что дополнительное введение адъювантов в состав вакцинного препарата не оказывало влияния на иммуногенность белков Su4 и PSPF, в состав которых входил внутрениний адъювант флагеллин. Протективная эффективность иммунного ответа на все варианты иммунизации была сопоставимой.

Таким образом, включение в состав рекомбинантных белков внутренних адъювантов обеспечивает развитие максимально возможного уровня иммунного ответа и его протективную эффективность в отношении соответствующих возбудителей бактериальной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследования выполнены на беспородных мышах-самках с массой 16–18 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово». Работа проводилась с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986 г.). Животных выводили из опыта с использованием эфирного наркоза.

Адъюванты. В качестве адъювантов использовали коммерческий препарат Alum-адъюванта (Sigma) и 1,5 % (вес/объем) взвесь карбоксиметилхитозана (КМХ) в физиологическом растворе (ФФБ). КМХ — О-карбоксиметил-(1,4-2-амино-2 дезокси)-β-D-глюкан, амфифильное производное, с заряженными гидрофильно-карбоксиметильными группами. Необходимое количество стерильного порошка КМХ взвешивали в ФФБ и оставляли для полного растворения в течение 18–20 часов.

Вакцинные белки. Использовали препараты рекомбинантных химерных белков PSPF (56 kDa) и Su4 (60 kDa), полученные в отделе молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ». Вакцинные препараты готовили смешиванием раствора белка и адъюванта в соотношении 2:1 и последующей инкубацией в течение часа при комнатной температуре для достижения лучшей сорбции антигенов на адъювантах.

Иммунизация мышей. Иммунизацию осуществляли двукратно с интервалом в 3 недели путем подкожных инъекций или интраназальной аппли-

кации белков Su4 и PSPF в дозе 20 мкг/мышь в разнообразных комбинациях с адъювантами. Состав вакцинных препаратов и наименования экспериментальных групп указаны в таблицах 1–3.

Через 21, 35 и 42 дня после начала иммунизации у экспериментальных животных проводили отбор крови из подчелюстной вены для контроля иммунного ответа.

Анализ протективной эффективности вакцинации. Через три недели после окончания вакцинации у мышей, иммунизированных PSPF, и контрольных животных вызывали пневмококковую инфекцию путем интраназального заражения *S. pneumoniae* 3 серотипа, штамм 73, из коллекции ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА» (Санкт-Петербург), в дозе 6,0 Ig КОЕ/мышь, в объеме 30 мкл. Через 24 и 48 часов от начала инфекции у мышей получали легкие для последующего анализа бактериальной нагрузки на орган.

У мышей, иммунизированных белком Su4, через три недели после окончания вакцинации вызывали стрептококковую инфекцию путем интраназального заражения *S. agalactiae* 1ab серотипа, штамм Н36, из коллекции ФГБНУ «ИЭМ» (Санкт-Петербург), в дозе 8,0 Ig КОЕ/мышь, в объеме 30 мкл. Через 3 и 5 часов от начала инфекции у мышей получали легкие для последующего анализа бактериальной нагрузки на орган. Количественную оценку выполняли методом счетного высева последовательных десятикратных разведений гомогената легких на плотную среду агар Шедлера для пневмококков и кровяного агар для СГВ.

Иммунологические методы. В сыворотке крови определяли суммарные IgG в общепринятом ИФА с применением коммерческих козых конъюгатов анти IgG мыши с пероксидазой хрена (Sigma).

Статистический анализ. Значимость различий оценивали с использованием критерия достоверности Стьюдента (t), критическое значение уровня значимости принималось равным 5 % (p < 0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ адъювантных свойств КМХ в составе интраназальной вакцины на основе химеры PSPF

Однократная интраназальная вакцинация мышей пневмохимерой без адъюванта и в присутствии КМХ не приводила к накоплению специфических IgG в сыворотке крови. Только у одной из шести мышей в каждой из двух сравниваемых групп уровень PSPF-специфических антител отличался от контроля (рис. 1).

Таблица 1. Экспериментальные группы для анализа адъювантных свойств КМХ в составе мукозальной (интраназальной) вакцины на основе химеры PSPF

Группы	PSPF	КМХ	ФФБ
Контроль ФФБ (n = 6)	-	-	+
Контроль КМХ (n = 6)	-	1,5 %	+
PSPF + ФФБ (n = 6)	20 мкг/мышь	-	+
PSPF+ КМХ (n = 6)	20 мкг/мышь	1,5 %	+

Таблица 2. Экспериментальные группы для анализа адъювантных свойств в составе парентеральной (подкожной) вакцины на основе PSPF

Группы	PSPF	КМХ	Alum	ФФБ
Контроль ФФБ (n = 6)	-	-	-	+
Контроль КМХ (n = 6)	-	1,5 %	-	+
Контроль Alum (n = 6)	-	-	50 мкг/мышь	+
Контроль Alum+ КМХ (n = 6)	-	1,5 %	50 мкг/мышь	+
PSPF +ФФБ	20 мкг/мышь	-	-	+
PSPF+ КМХ (n = 6)	20 мкг/мышь	1,5 %	-	+
PSPF+ Alum (n = 6)	20 мкг/мышь	-	50 мкг/мышь	+
PSPF+ Alum+ КМХ (n = 6)	20 мкг/мышь	1,5 %	50 мкг/мышь	+

Таблица 3. Экспериментальные группы для анализа адъювантных свойств КМХ в составе парентеральной (подкожной) вакцины на основе Su4

Группы	Su4	КМХ	ФФБ
Контроль ФФБ (n = 6)	-	-	+
Контроль КМХ (n = 6)	-	1,5 %	+
Su4 + ФФБ (n = 6)	20 мкг/мышь	-	+
Su4 +КМХ (n = 6)	20 мкг/мышь	1,5 %	+

Повторная иммунизация стимулировала накопление специфических антител. К 35 и 42 дню от начала вакцинации в сыворотке крови содержание специфических IgG продолжало постепенно нарастать, однако не было выявлено достоверных различий между иммуногенностью пневмохимеры в свободном виде и в присутствии карбоксиметилхитозана (рис. 1).

Сравнительный анализ протективной эффективности иммунизации различными вариантами вакцин выявил две различные тенденции в развитии экспериментальной инфекции в сравниваемых группах. При интраназальном заражении мышей, вакцинированных пневмохимерой без КМХ, через 48 часов от на-

чала инфекции наблюдали накопление пневмококка в легких контрольных мышей и отсутствие возбудителя в легких иммунных животных (рис. 2). Это свидетельствовало о защитной эффективности сформированного иммунного ответа.

После интраназальной вакцинации пневмохимерой в присутствии КМХ не только у иммунных, но даже у контрольных мышей, получавших интраназально только препарат КМХ, не было отмечено какого-либо существенного накопления

пневмококка в легких через 24 и 48 часов после заражения (рис. 3).

Таким образом, КМХ в составе мукозальной интраназальной вакцины не обеспечивал адъювантного эффекта в отношении гуморального IgG иммунного ответа на пневмохимеру PSPF. Следует отметить, что двукратное введение КМХ мышам способствовало повышению их общей устойчивости к пневмококковой инфекции по сравнению с мышами, получавшими интраназально обычный физиологический раствор.

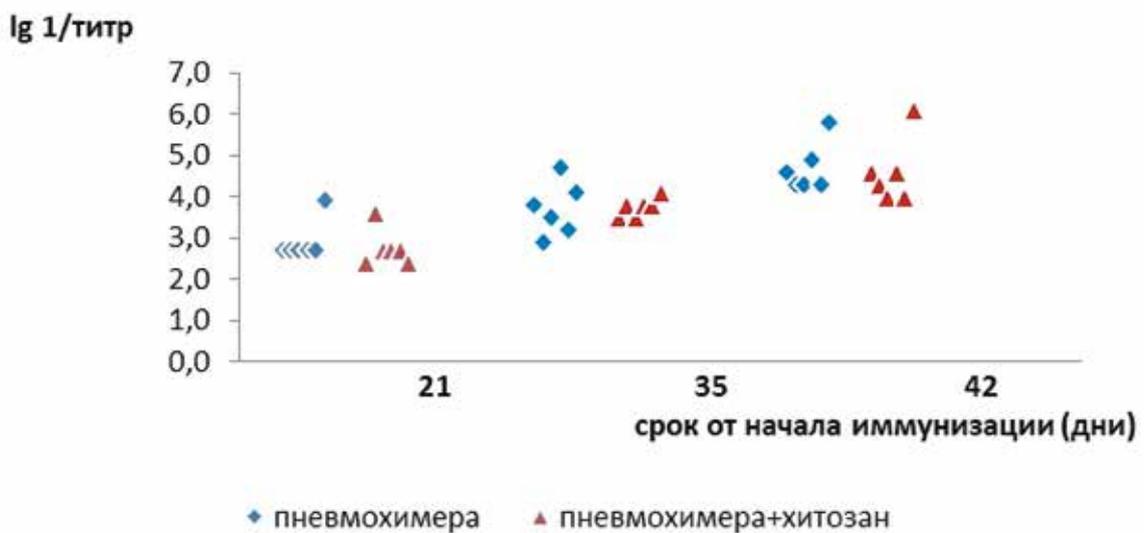


Рис. 1. Уровень специфических IgG в сыворотке крови после интраназальной иммунизации мышей пневмохимерой в свободном виде и при наличии хитозана

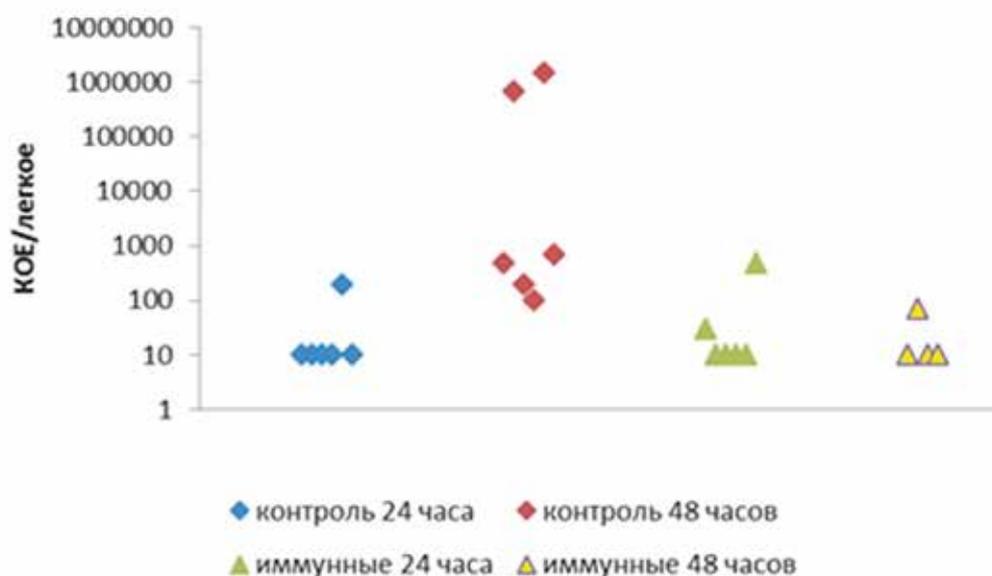


Рис. 2. Содержание пневмококков в легких в динамике инфекции у мышей, иммунизированных интраназальной химерой PSPF в свободной форме

КМХ не был зарегистрирован. Следует заметить, что к 42 дню отмечается даже тенденция к снижению содержания IgG антител в группе с КМХ. Вместе с тем отсутствовал и адьювантный эффект коммерческого препарата Alum.

Заражение иммунных мышей пневмококком в сублетальной дозе выявило закономерности, аналогичные тем, что были отмечены при интраназальной вакцинации. В контрольной группе,

получавшей подкожно ФФБ, отмечали тенденцию к нарастанию содержания пневмококков в легких через 48 часов после заражения. Иммунные животные были защищены и свободны от возбудителя полностью (рис. 6).

Введение в вакцинный препарат КМХ приводило к полному очищению от пневмококка не только иммунных, но и контрольных мышей через 48 часов после инфекции (рис. 7).

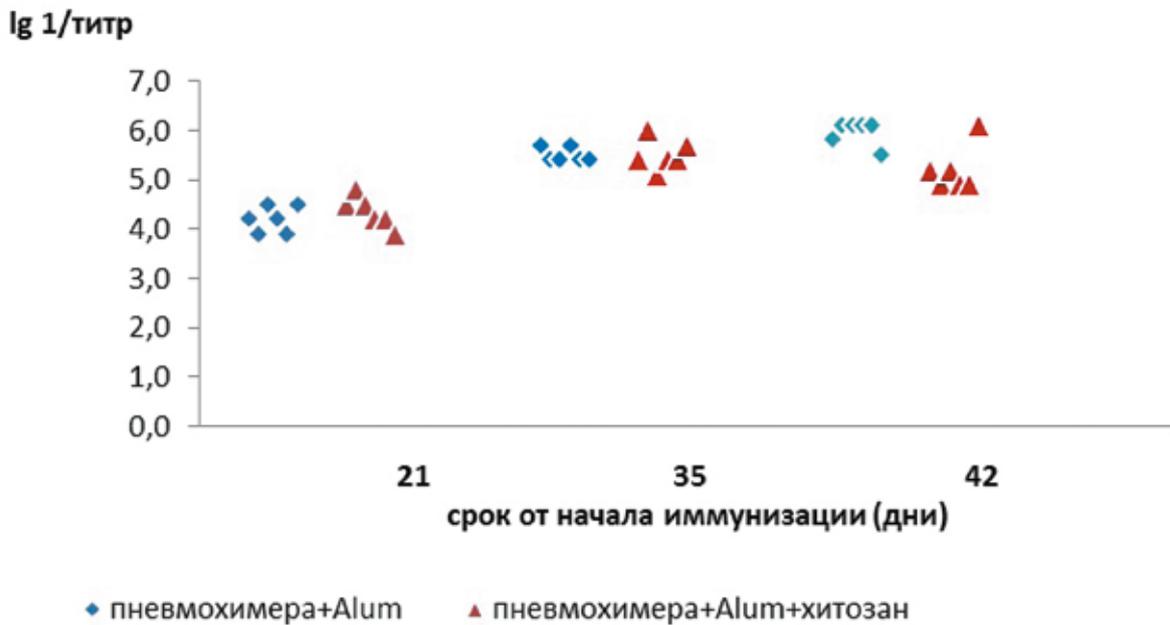


Рис. 5. Уровень специфических IgG в сыворотке крови после подкожной иммунизации мышей пневмохимерой в сочетании с Alum или смеси Alum и КМХ

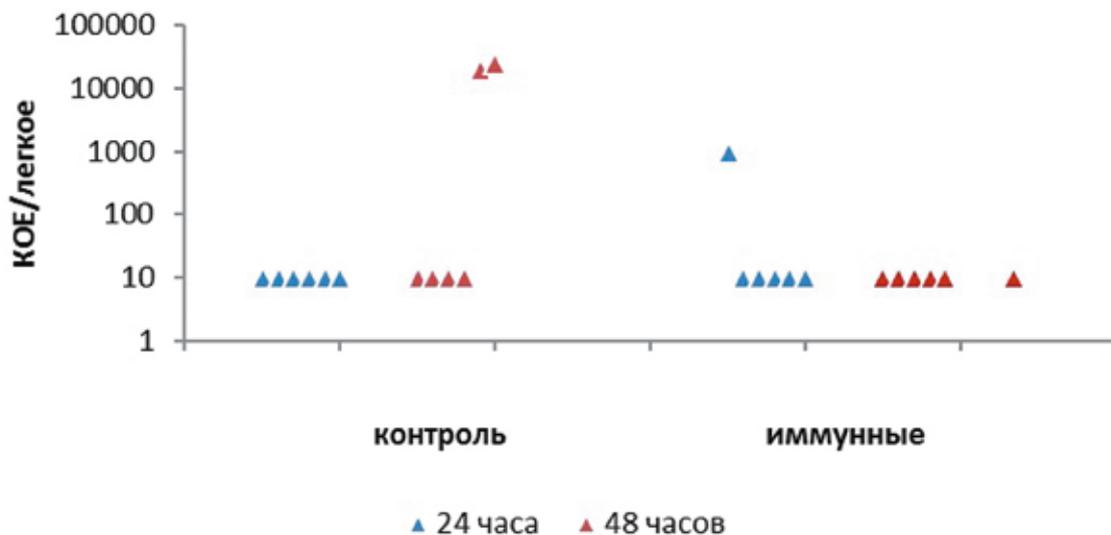


Рис. 6. Содержание пневмококков в легких в динамике инфекции у мышей, иммунизированных подкожно химерой PSPF в свободной форме

Через 24 часа от начала инфекции было отмечено некоторое снижение содержания пневмококков в легких мышей, иммунизированных пневмохимерой с КМФ, но статистический анализ показателей достоверных отличий не выявил.

Введение в вакцинный препарат алюминия никак не сказалось на процессе реализации иммунной защиты при пневмококковой инфекции, и динамика очищения легких экспериментальных мышей практически повторяла картину, полученную для КМХ (рис. 7).

Таким образом, КМХ, введенный в состав парентеральной подкожной вакцины, не обеспечивал

адьювантного эффекта в отношении пневмохимеры PSPF. Следует отметить, что двукратное введение КМХ нормальным мышам во время иммунизации в качестве контроля способствовало повышению их устойчивости к пневмококковой инфекции по сравнению с мышами, получавшими подкожно ФФБ.

Анализ адьювантных свойств КМХ в составе парентеральной (подкожной) вакцины на основе Su4

После первой вакцинации мышей стрептохимерой Su4 было отмечено достоверное превышение уровня специфических IgG в сыворотке крови мы-

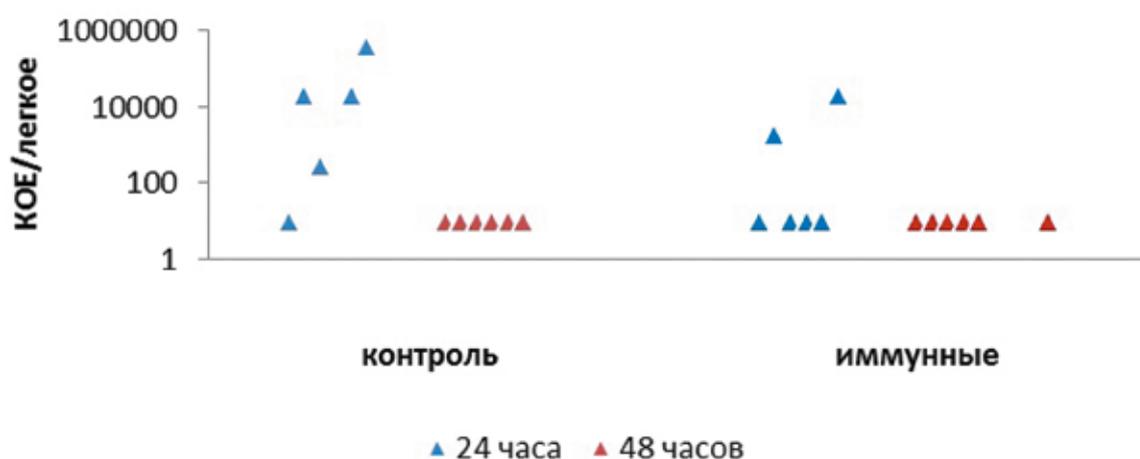


Рис. 7. Содержание пневмококков в легких в динамике инфекции у мышей, иммунизированных подкожно химерой PSPF в смеси с КМХ

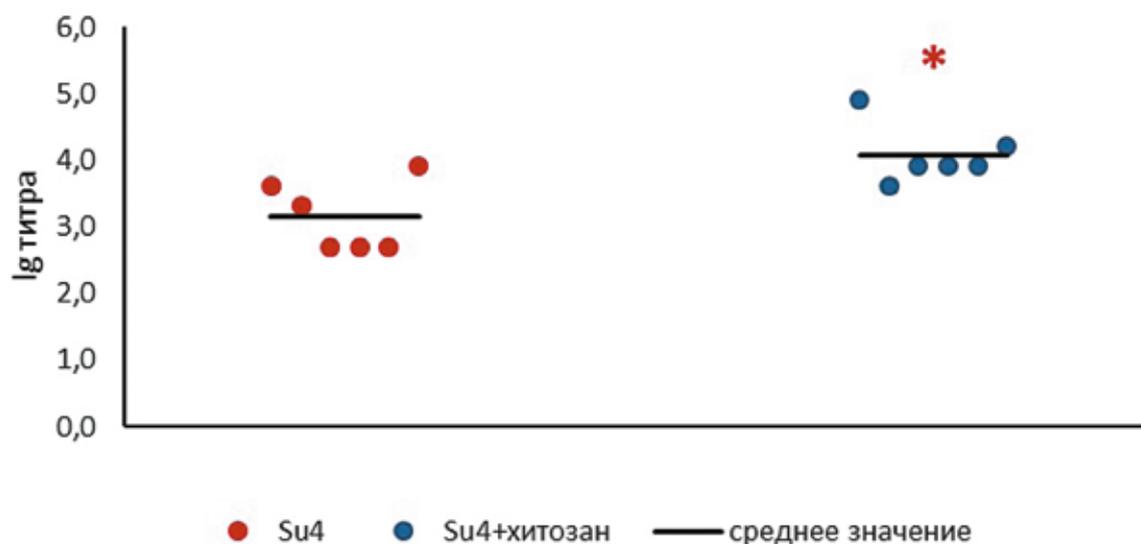


Рис. 8. Уровень Su4-специфических IgG в сыворотке крови через 21 день после начала иммунизации полипептидом Su4

шей, вакцинированных препаратом Su4, содержащим карбоксиметилхитозан (рис. 8).

Через две недели после повторной вакцинации (42 дня) в обеих группах уровень специфических антител в сыворотке крови животных, вакцинированных Su4 как в свободной форме, так и с КМФ, был одинаковым (рис. 9 и 10).

Клиническую эффективность вакцинации оценивали в процессе инфекции животных после интраназального введения стрептококка группы В серотипа Iab, штамм H36, в дозе 8,0 lg КОЕ.

Мыши, иммунизированные Su4, через 24 часа были свободны от возбудителя в обеих иммунных группах, имеющих в качестве контроля либо ФФБ, либо КМХ, тогда как у неиммунных животных СГВ выделяли из легких в высоком титре (рис. 11, 12).

Отличий в устойчивости животных к СГВ между сравниваемыми группами Su4 в смеси с КМХ и Su4 в смеси с ФФБ не было выявлено (рис. 11 и 12).

Следует отметить, что и в этой серии экспериментов контрольные мыши, дважды получавшие

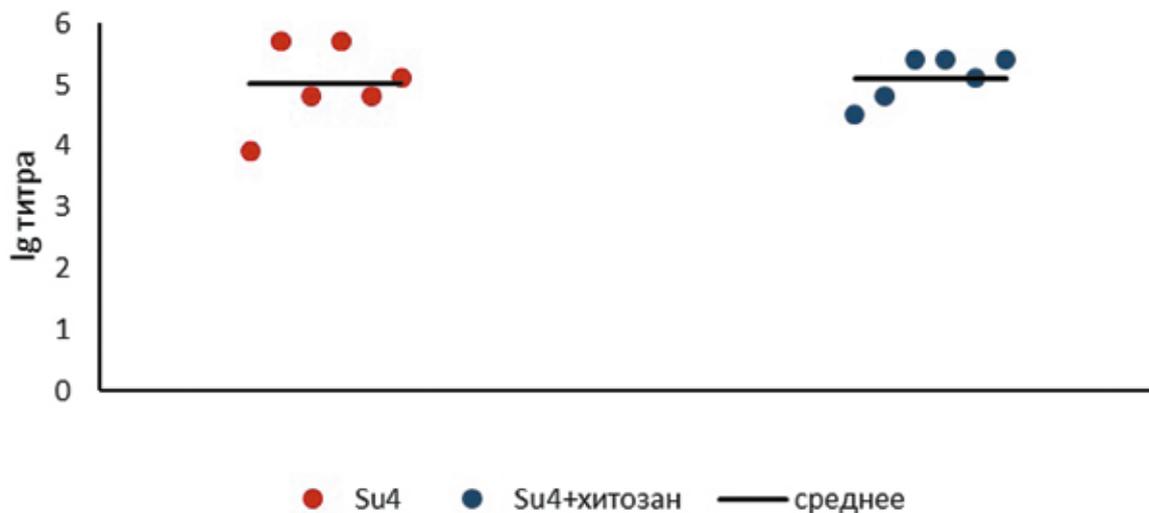


Рис. 9. Уровень Su4-специфических IgG в сыворотке крови через 35 дней после начала иммунизации полипептидом Su4

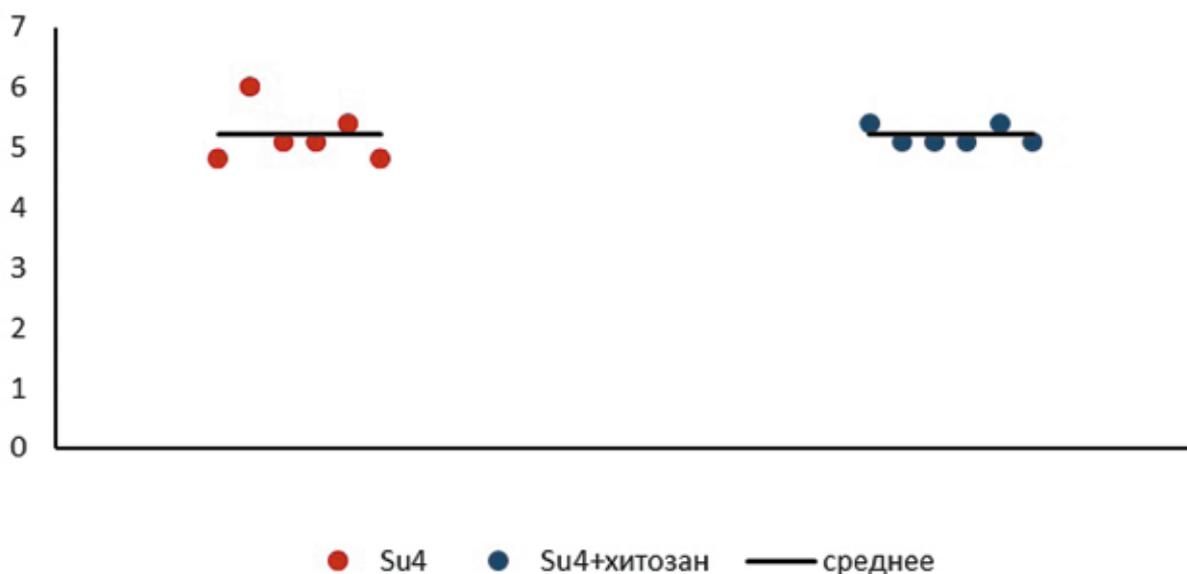


Рис. 10. Уровень Su4-специфических IgG в сыворотке крови через 42 дня после начала иммунизации полипептидом Su4

КМХ подкожно, демонстрировали тенденцию более быстрого освобождения от СГВ по сравнению с мышами, получившими ФФБ в том же режиме.

В смеси со стрептохимерой Su4 КМХ обеспечивал достоверный адьювантный эффект в уровне гуморального ответа только после однократной вакцинации. Повторная вакцинация нивелировала различия между группами. Протективный потенциал иммунной защиты, вызванной Su4, в присутствии КМХ и в свободной форме, не отличался, обе группы животных освобождались от возбудителя с одинаковой скоростью.

ОБСУЖДЕНИЕ

Адьювантные свойства солей и окислов алюминия хорошо известны. Препарат Alum, основой которого является гидроксид алюминия, наиболее широко применяется в качестве вакцинного адьюванта [12]. Считается, что адьювантный эффект достигается за счет формирования «депо» белков и продолжительного поступления антигенов в циркуляцию, а также за счет размеров частиц (< 10 μm) с адсорбированными вакцинными антигенами, способными оптимальным образом представлять антигены иммунокомпетентным клеткам [13].



Рис. 11. Содержание бактерий в легких мышей, иммунизированных Su4, через 3 и 24 часа после заражения СГВ

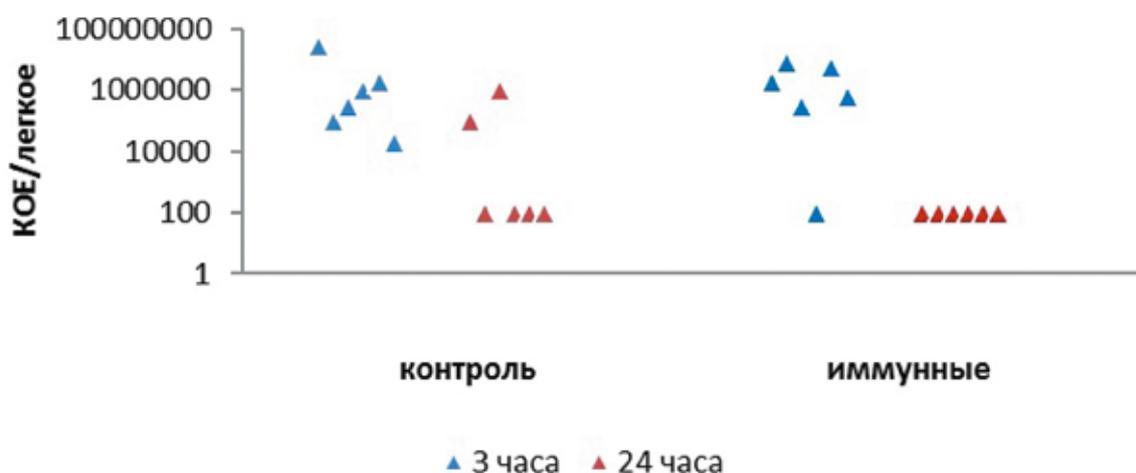


Рис. 12. Содержание бактерий в легких мышей, иммунизированных Su4 в смеси с КМХ, через 3 и 24 часа после заражения СГВ

Благодаря наличию большого количества гидрофильно-карбоксиметильных групп КМХ также обладает высокими адгезивными свойствами, способностью менять заряд в зависимости от pH среды, а значит, в разной степени взаимодействовать с молекулами белка, общий заряд которых зависит от кислотности среды. Вероятно, сила взаимодействия КМХ и белковых молекул играет решающую роль в способности КМХ проявлять адьювантный эффект [14].

Исследование дополнительного адьювантного эффекта препарата карбоксиметилхитозана и Alum Inject было проведено на модели иммунного ответа на вакцинацию двумя различными рекомбинантными химерными белками, экспериментальными вакцинными препаратами для профилактики бактериальных инфекций.

На модели химерного рекомбинантного белка PSPF изучен адьювантный потенциал КМХ в составе мукозальной и парентеральной вакцины, а также исследована его возможная активность в роли коадьюванта совместно со стандартным адьювантом Alum. Не было обнаружено различий в силе специфического гуморального IgG ответа на PSPF вакцину, введенную без адьювантов или совместно с каждым адьювантом или их смесью. Мукозальная и парентеральная формы PSPF вакцины стимулировали формирование клинически эффективной иммунной защиты против пневмококковой инфекции независимо от состава вакцины и пути вакцинации.

По отношению к белку Su4 КМХ проявил адьювантные свойства только после первой иммунизации. Усиление IgG иммунного ответа было достоверно зарегистрировано через 21 день после начала введения Su4-вакцины (рис. 11). Повторная вакцинация Su4 приводила к выравниванию показателей гуморального иммунного ответа в сравниваемых экспериментальных группах. Протективная эффективность иммунной защиты была изучена после второй вакцинации на фоне одинакового иммунного ответа. Соответственно, процесс очищения от СГВ инфекции не отличался у мышей, получавших вакцину с КМХ и без него.

В работе показано, что при наличии КМХ и/или адьюванта Alum иммуногенность белка PSPF не менялась. Ранее нами была установлена относительно высокая иммуногенность белка PSPF. Возможно, отсутствие дополнительной стимуляции при добавлении адьювантов связано с максимально возможной интенсивностью иммунного ответа на собственно белок PSPF. Поскольку адьювантный эффект производных хитозана и Alum обусловлен его химической полимерной струк-

турой и способностью формировать антигенное депо, можно предположить, что PSPF в силу наличия в молекуле внутреннего адьюванта добивается максимальной иммунной реакции за счет других механизмов, в частности запуска реакций врожденного иммунитета через взаимодействие флагеллинового фрагмента с TLR5. Синергия механизмов врожденного и адаптивного иммунитета является условием развития эффективного иммунного ответа на антиген [15].

В качестве дополнительного наблюдения следует отметить важную закономерность, связанную с использованием собственно препарата КМХ. Зарегистрировано, что устойчивость к инфекции у контрольных мышей, получавших КМХ двукратно в виде инъекций под кожу или аппликаций на слизистую носа, была выше, чем у мышей, получавших физиологический раствор. Доказательства специфической достоверности полученных результатов, которые заслуживают внимания, требуют дополнительных исследований на большем численном основании. В литературе имеются данные относительно антивирусной [16, 17] и антибактериальной [18, 19] активности хитозана и его производных. Вероятно, что данный феномен обусловлен способностью хитозана неспецифически активировать реакции врожденного иммунитета [20].

Итогом проделанной работы является вывод о том, что дополнительное введение двух известных и широко используемых в практике адьювантов в состав вакцинного препарата не оказывало влияния на иммуногенность белков Su4 и PSPF, кандидатных вакцинных препаратов, в структуру которых входил внутренний адьювант флагеллин, а также на протективную эффективность сформированного иммунного ответа в отношении исследованных бактериальных инфекций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследование двух химерных белковых препаратов, содержащих в своей структуре флагеллин в качестве внутреннего адьюванта, показало, что включение в структуру рекомбинантных белков внутренних адьювантов является перспективной стратегией повышения иммуногенности и эффективности рекомбинантных белков в качестве компонентов профилактических вакцинных препаратов.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. / The authors declares no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Christodoulides M, Jolley KA, Heckels JE. Recombinant proteins in vaccine development. *Methods Mol Med.* 2001;66:167–80. DOI: 10.1385/1-59259-148-5:167. PMID: 21336755.
2. Suvorov A, Dukhovlinov I, Leontieva G, et al. Chimeric Protein PSPF, a Potential Vaccine for Prevention Streptococcus pneumoniae Infection January 2015 *Journal of Vaccines and Vaccination* 06(06) DOI: 10.4172/2157-7560.1000304.
3. Laiño J, Villena J, Suvorov A, et al. Nasal immunization with recombinant chimeric pneumococcal protein and cell wall from immunobiotic bacteria improve resistance of infant mice to Streptococcus pneumoniae infection. *PLoS One.* 2018 Nov 5;13(11):e0206661. DOI: 10.1371/journal.pone.0206661. PMID: 30395582; PMCID: PMC6218053.
4. Hu MC, Walls MA, Stroop SD, et al. Immunogenicity of a 26-valent group A streptococcal vaccine. *Infect Immun.* 2002;70(4):2171–7.
5. Dale JB, Walker MJ. Update on group A streptococcal vaccine development. *Curr Opin Infect Dis.* 2020 Jun;33(3):244–250. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000644.
6. Shan P, Wang Z, Li J, et al. A New Nano Adjuvant of PF3 Used for an Enhanced Hepatitis B Vaccine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 May 10;10:903424. DOI: 10.3389/fbioe.2022.903424. PMID: 35620473; PMCID: PMC9127465.
7. Guan LJ, Pei SX, Song JJ, et al. Screening immune adjuvants for an inactivated vaccine against Erysipelothrix rhusiopathiae. *Front Vet Sci.* 2022 Jul 26;9:922867. DOI: 10.3389/fvets.2022.922867. PMID: 35958306; PMCID: PMC9360596.
8. Kwissa M, Kasturi SP, Pulendran B. The science of adjuvants. *Expert Rev Vaccines.* 2007 Oct;6(5):673–84. DOI: 10.1586/14760584.6.5.673. PMID: 17931149.
9. Petrovsky N. Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs. *Drug Saf.* 2015 Nov;38(11):1059–74. DOI: 10.1007/s40264-015-0350-4.
10. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410: 1099–1103.
11. Filimonova VYu, Dukhovlinov IV, Kramskaya TA, et al. Chimeric proteins based on immunogenic epitopes of surface pathogenicity factors of streptococci as a vaccine for the prevention of infection caused by group B streptococci. *Academic Medical Journal*, 2016, vol. 16, No. 3, 82–89. In Russian [Филимонова В.Ю., Духовлинов И.В., Крамская Т.А. и др. Химерные белки на основе иммуногенных эпитопов поверхностных факторов патогенности стрептококков в качестве вакцины для профилактики инфекции, вызванной стрептококками группы В. *Медицинский академический журнал*, 2016, т. 16, № 3, 82–89.]
12. Kool M, Fierens K, Lambrecht BN. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *J Med Microbiol.* 2012 Jul;61(Pt 7):927–934. DOI: 10.1099/jmm.0.038943-0.
13. RK Gupta 1 Aluminum compounds as vaccine adjuvants *Adv Drug Deliv Rev* 1998 Jul 6;32(3):155–172. DOI: 10.1016/s0169-409x(98)00008-8).
14. Zhao K, Han J, Zhang Y, et al. Enhancing Mucosal Immune Response of Newcastle Disease Virus DNA Vaccine Using N-2-Hydroxypropyl Trimethylammonium Chloride Chitosan and N,O-Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles as Delivery Carrier. *Mol Pharm.* 2018 Jan 2;15(1):226–237. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00826. Epub 2017 Dec 6. PMID: 29172532.
15. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7:179–190. DOI: 10.1038/nri2038.
16. Kulikov SN, Chirkov SN, Ilyin AV. Influence of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Applied biochemistry and microbiology.* — 2006. — Т. 42. — No. 2. — S. 224–228. In Russian [Куликов С.Н., Чирков С.Н., Ильина А.В. Влияние молекулярной массы хитозана на его противовирусную активность в растениях. *Прикладная биохимия и микробиология.* — 2006. — Т. 42. — № 2. — С. 224–228.]
17. Makimura YY, Watanabe S, Suzuki T., et al. Chemoenzymatic synthesis and application of a sialoglycopolymer with a chitosan backbone as a potent inhibitor of human influenza virus hemagglutination. *Carbohydr Res.* — 2006. — Vol. 341. — P. 1803–1808.
18. Lim SH, Hudson SM. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. *J. Macromol. Sci.* — 2003. — Vol. 43. — N. 2. — P. 223–269.
19. Lin SB, Lin YC, Chen HH. Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: characterisation and antibacterial activity. *Food Chemistry.* — 2009. — Vol. 116. — N. 1. — P. 47–53.
20. Moine L, Canali MM, Porporatto C, Correa SG. Reviewing the biological activity of chitosan in the mucosa: Focus on intestinal immunity. *Int J Biol Macromol.* 2021 Oct 31;189:324–334. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.098.

Информация об авторах:

Леонтьева Галина Федоровна, к.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

Крамская Татьяна Анатольевна, к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

Грабовская Корнелия Борисовна, к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

Гупалова Татьяна Виталиевна, д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

Дмитриев Александр Валентинович, д.б.н., директор ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

Суворов Александр Николаевич, д.м.н., заведующий отделом ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Author information:

Leontieva Galina F., Cand. Sc. (Biology), Leading Researcher, Institute of Experimental Medicine;

Kramskaya Tatyana A., Cand. Sc. (Biology), Senior Researcher, Institute of Experimental Medicine;

Grabovskaya Kornelia B., Cand. Sc. (Biology), Senior Researcher, Institute of Experimental Medicine;

Gupalova Tatyana V., D.Sc. (Biology), Leading Researcher, Institute of Experimental Medicine;

Dmitriev Alexander V., D.Sc. (Medicine), director, Institute of Experimental Medicine;

Suvorov Alexander N., D.Sc. (Medicine), Head of Department, Institute of Experimental Medicine.