



# Доклиническое изучение иммуногенности четырёхвалентной субъединичной противогриппозной вакцины, содержащей корпускулярный адъювант

Красильников И.В.<sup>1✉</sup>, Иванов А.В.<sup>1</sup>, Николаева А.М.<sup>1</sup>, Белякова О.В.<sup>1</sup>, Шевченко Е.К.<sup>1</sup>, Михайлова Н.А.<sup>2</sup>, Ленева И.А.<sup>2</sup>, Зверев В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ООО «Развитие биотехнологий», Москва, Россия;

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

## Аннотация

**Актуальность.** Вакцинопрофилактика является важным стратегическим аспектом защиты населения от тяжёлых последствий эпидемий гриппа. Актуальна разработка эффективных тетравалентных вакцин, содержащих антигены двух линий гриппа А (H1N1, H3N2) и двух линий гриппа В (Виктория, Ямагата) с добавлением иммуoadъюванта.

**Целью** работы явилось доклиническое изучение иммуногенности и защитной эффективности инновационного препарата — тетравалентной субъединичной вакцины, содержащей антигены вирусов гриппа А и В, а также корпускулярный адъювант.

**Материалы и методы.** Исследования выполнены на мышах-самках линии BALB/c. Тетравалентную вакцину и моновалентные полуфабрикаты с бетулиновым адъювантом вводили внутривенно двукратно с интервалом 14 дней. Иммуногенную активность оценивали по реакции торможения гемагглютинации. Протективную активность вакцины оценивали по изменению вирусной нагрузки, массы тела и выживаемости животных на модели летальной инфекции, вызванной вирусом гриппа А подтипа H1N1.

**Результаты.** У мышей, вакцинированных четырёхвалентной субъединичной противогриппозной вакциной с корпускулярным адъювантом, наблюдалось образование антител в отношении всех четырех вирусов гриппа, входящих в состав вакцины, средние титры антител в реакции торможения гемагглютинации были выше 1 : 40. В результате второй вакцинации наблюдался выраженный прирост антител в отношении всех четырех вирусов гриппа. Доза четырёхвалентной субъединичной вакцины с корпускулярным адъювантом, содержащая по 5 мкг каждого антигена и 200 мкг адъюванта, обеспечивала 100% выживаемость мышей, а также во всех изученных дозах значительно снижала титр вируса в лёгких у животных (более 3 lg ТЦИД<sub>50</sub>) в модели гриппозной пневмонии.

**Заключение.** Четырёхвалентная субъединичная вакцина с корпускулярным адъювантом на основе бетулина демонстрирует высокую иммуногенность у лабораторных мышей и обеспечивает защиту от летальной пневмонии, вызванной вирусом гриппа А подтипа H1N1.

**Ключевые слова:** четырёхвалентная субъединичная вакцина с корпускулярным адъювантом, доклинические исследования, вирус гриппа, тетравалентная вакцина, адъювант

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 02.04.2018).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность за содействие коллегам и всем участникам ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

**Источник финансирования.** Исследования проводились с привлечением средств Государственного контракта от 02.06.2017 № 14.N08.11.0149 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Красильников И.В., Иванов А.В., Николаева А.М., Белякова О.В., Шевченко Е.К., Михайлова Н.А., Ленева И.А., Зверев В.В. Доклиническое изучение иммуногенности четырёхвалентной субъединичной противогриппозной вакцины, содержащей корпускулярный адъювант. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022;99(3):300–308.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-244>

# Preclinical study of immunogenicity of adjuvanted quadrivalent subunit influenza vaccine

Igor V. Krasilnikov<sup>1✉</sup>, Aleksandr V. Ivanov<sup>1</sup>, Alevtina N. Nikolaeva<sup>1</sup>, Olga V. Belyakova<sup>1</sup>, Evgeny K. Shevchenko<sup>1</sup>, Nataliya A. Mikhailova<sup>2</sup>, Irina A. Leneva<sup>2</sup>, Vitaly V. Zverev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>LLC "Biotechnology development", Moscow, Russia;

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

## Abstract

**Background.** Preventive vaccination is a vitally important strategic aspect of protection of the population against severe effects of influenza epidemics. The priority attention is given to development of effective tetravalent vaccines containing antigens of two influenza A lineages (H1N1, H3N2) and two influenza B lineages (Victoria and Yamagata) in combination with immunoadjuvants.

The **aim** of the work was to conduct the preclinical study of the immunogenicity and protective efficacy of the innovative tetravalent subunit vaccine containing antigens of influenza A and B viruses as well as a corpuscular adjuvant.

**Materials and methods.** The study was conducted using female BALB/c mice. The tetravalent vaccine and monovalent intermediate vaccines combined with a betulin adjuvant were injected intraperitoneally two times at a 14-day interval. The immunogenic activity was measured by the hemagglutination inhibition assay. The protective activity of the vaccine was assessed by changes in the viral load, body weight and survival rates using the mouse model of fatal influenza A H1N1 virus infection.

**Results.** The mice vaccinated with the adjuvanted quadrivalent subunit influenza vaccine produced antibodies against all four influenza viruses included in the vaccine; the mean antibody titers in the hemagglutination inhibition assay were above 1 : 40. The second-dose vaccination induced a significant increase in levels of antibodies against all four influenza viruses. The dose of the quadrivalent subunit adjuvanted vaccine containing 5 µg of each antigen and 200 µg of the adjuvant provided a 100% survival rate in mice and significantly decreased lung viral titers (more than 3 lg TCID<sub>50</sub>) in the mouse model of influenza pneumonia.

**Conclusion.** The quadrivalent subunit vaccine with the betulin-based corpuscular adjuvant demonstrates high immunogenicity in laboratory mice and provides protection against fatal pneumonia caused by the influenza A virus subtype H1N1.

**Keywords:** *adjuvanted quadrivalent subunit vaccine, preclinical studies, influenza virus, tetravalent vaccine, adjuvant*

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera (protocol No. 6, April 2, 2018).

**Acknowledgements.** The authors express their gratitude for assistance and support to their associates and to all participants of the Federal Target Program "The Development of the Pharmaceutical and Medical Industry of the Russian Federation till 2020 and in the Long Term".

**Funding sources.** The study was funded through Government Contract No. 14.N08.11.0149 of 2/6/2017 under the Federal Target Program "The Development of the Pharmaceutical and Medical Industry of the Russian Federation till 2020 and in the Long Term".

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Krasilnikov I.V., Ivanov A.V., Nikolaeva A.N., Belyakova O.V., Shevchenko E.K., Mikhailova N.A., Leneva I.A., Zverev V.V. Preclinical study of immunogenicity of adjuvanted quadrivalent subunit influenza vaccine. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii.* 2022;99(3):300–308.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-244>

## Введение

Ограничения специфической химиотерапии гриппа (появление резистентных штаммов, проблемы безопасности) обуславливают актуальность вакцинопрофилактики как основного подхода борьбы с гриппом [1]. В то же время инактивиро-

ванные вакцины против гриппа, в том числе сезонные трёхвалентные, используемые для ежегодной профилактики гриппа в осенне-зимний период, не всегда эффективны для ряда популяционных групп: маленьких детей, беременных, пожилых людей, лиц с различными хроническими заболеваниями, кото-

рых относят к группам риска по гриппу, а также в отношении антигенно отличных штаммов (дрейфовых и гетерологичных), не содержащихся в вакцине [2–4]. Следует также помнить, что имеющихся мощностей всех производителей противогриппозных вакцин может быть недостаточно для обеспечения массовой вакцинопрофилактики, тем более при возникновении пандемии.

Для повышения эффективности инактивированных вакцин против гриппа предложено производить четырёхвалентные вакцины (ЧВ) с включением в состав 2 линий вируса гриппа А (H1N1, H3N2) и 2 линий вируса гриппа В (Ямагатской и Викторианской) [5, 6], а также добавлять иммуноадьюванты [7]. При использовании адьювантов появляется возможность повысить иммуногенность вакцин против гриппа в отношении набора антигенно отличных штаммов, а также при иммунизации различных популяционных групп, в том числе групп риска [8].

В настоящее время для повышения иммуногенности вакцин в экспериментальных и клинических исследованиях тестируют адьюванты различного происхождения:

- минеральные (гидроксид или фосфат алюминия);
- растительные (сапонины — QuilA, QS21);
- микробные (целые убитые бактерии, очищенный бактериальный липополисахарид и его производные, CpG-мотивы ДНК);
- синтетические полимерные (полиоксидоний, совидон) [9, 10].

Перспективным направлением в данной области являются адьюванты на основе тритерпеноидов бересты [11]. Соединения на основе природного бетулина имеют выраженный спектр биологической активности (противомикробное, противогрибковое, противовирусное, гепатопротективное, антиоксидантное действия) и, наряду с биобезопасностью, обладают адьювантными свойствами [12].

**Целью** работы явилось доклиническое изучение иммуногенности и защитной эффективности инновационного препарата — тетравалентной субъединичной вакцины, содержащей антигены вирусов гриппа А (H1N1, H3N2) и В (Виктория, Ямагата), а также корпускулярный адьювант (КА) на основе природного бетулина.

## Материалы и методы

В экспериментах использовали вакцину «Тетравалентная вакцина гриппозная субъединичная, содержащая адьювант на основе природного бетулина, суспензия для внутримышечного введения», производства ЗАО «Институт новых медицинских технологий».

В 0,5 мл объёма вакцины для клинического применения содержится:

- 5 мкг антигена штамма A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09;
- 5 мкг антигена штамма A/Hong-Kong/4801/2014 (H3N2);
- 5 мкг антигена штамма B/Brisbane/60/2008;
- 5 мкг антигена штамма B/Phuket/3073/2013;
- 200 мкг КА;
- фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) до 0,5 мл.

Использовали КА (опытная серия А-1; ЗАО «Институт новых медицинских технологий»), разработанный в ФСБ. В исследованиях использовали концентрации адьюванта 1000 и 200 мкг.

В 0,5 мл моновалентных образцах содержалось:

- 5 мкг антигена каждого из штаммов, входящих в образец вакцины с КА;
- 200 мкг КА;
- ФСБ до 0,5 мл.

В качестве плацебо использовали ФСБ, содержащий адьювант в концентрации 400 мкг/мл.

## Оценка антиген-специфического гуморального иммунитета

Оценка антиген-специфического гуморального иммунитета и протективности вакцины была проведена на базе НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова в соответствии с этическими нормами и требованиями<sup>1</sup>, Надлежащей доклинической практикой<sup>2</sup>, Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств<sup>3</sup>.

Эксперименты выполняли на мышах-самках BALB/c массой 12–14 г, полученных из питомника НИЦ биомедицинских технологий РАМН «Андреевка» (Московская обл.). Животные были разбиты на 6 групп по 12 особей в каждой. Вакцину (1-я группа) и моновалентные образцы (A/Michigan/45/2015 (H1N1) — 2-я группа; A/Hong-Kong/4801/2014 (H3N2) — 3-я группа; B/Brisbane/60/2008 — 4-я группа; B/Phuket/3073/2013 — 5-я группа), входящие в состав вакцины, с КА вводили по 0,25 мл мышам внутривенно двукратно с интервалом 14 сут. Животным 6-й, контрольной, группы вместо

<sup>1</sup> Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

<sup>2</sup> International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use. Guideline for good clinical practice. URL: <https://ichgcp.ru>; ГОСТ 22044-2014 — Принципы надлежащей лабораторной практики, Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (ви-вариев) (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51), Приказ МЗ России от 01.04.2016 № 199-н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

<sup>3</sup> Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.; 2012.

препаратов вакцины в соответствующие дни вводили по 0,25 мл стерильного раствора плацебо внутривентриально.

На 14-е сутки после 1-й иммунизации у 6 мышей в каждой из групп были отобраны пробы крови, а остальные животные, за исключением контрольной группы, были повторно иммунизированы соответствующими препаратами вакцин или плацебо по 0,25 мл внутривентриально. Сыворотки крови от каждого из 6 животных в группах были получены на 14-е сутки после 2-й иммунизации. Для определения титра специфических антител в сыворотках крови иммунизированных животных использовали классический метод торможения геагглютинации.

#### *Исследование протективности вакцины*

Исследование протективных свойств ЧВ против гриппа КА на основе бетулина проводили на мышах-самках BALB/c массой 12–14 г, полученных из питомника НЦ биомедицинских технологий РАМН «Андреевка» (Московская обл.).

Исследуемые вакцины были изучены в следующих дозах:

- 1) ЧВ с КА в дозе по 0,5 мкг каждого антигена, 200 мкг КА — 0,1 вакцинной дозы;
- 2) ЧВ с КА в дозе по 5 мкг каждого антигена, 200 мкг КА — 1 вакцинная доза;
- 3) ЧВ с КА в дозе по 25 мкг каждого антигена, 200 мкг КА — 5 вакцинных доз;
- 4) КА, 200 мкг (суммарная доза 2 иммунизаций);
- 5) КА, 1000 мкг (суммарная доза 2 иммунизаций);
- 6) моновалентная вакцина вируса гриппа А (H1N1) в дозе 5 мкг;
- 7) плацебо (ФСБ, 200 мг КА).

Всех животных иммунизировали приготовленными препаратами вакцин по 0,25 мл внутривентриально двукратно с интервалом 14 сут. Животным из контрольной группы вместо препаратов вакцины в соответствующие дни вводили по 0,25 мл стерильного раствора плацебо внутривентриально.

Для моделирования гриппозной инфекции был использован штамм вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (пандемия H1N1 2009), адаптированный к мышам. Через 14 сут после 2-й иммунизации мышей животных (по 18 мышей в группе) заражали вирусом гриппа А/Калифорния/04/09 (H1N1), адаптированным к мышам, в дозе 100 ЛД<sub>50</sub> на мышь. Мышей заражали интраназально под лёгким эфирным наркозом аллантоисным вирусом в объёме 50 мкл на обе ноздри. За животными вели ежедневное наблюдение в течение последующих 16 сут, в первые 5 сут после инфицирования мышей взвешивали каждый день, далее — через сутки.

Протективную активность образцов на модели гриппозной пневмонии мышей оценивали по трем критериям:

- летальность в группах иммунизированных и контрольных мышей;
- выделяемость вируса в лёгких иммунизированных и контрольных мышей;
- снижение массы тела животных.

Уменьшение или увеличение массы рассчитывали отдельно для каждой мыши и выражали в процентах. За 100% принимали массу животного перед инфицированием. Для всех мышей одной группы определяли среднее значение процента потери или увеличения массы тела.

#### *Определение титра вируса в лёгких мышей*

На 4-е сутки после инфицирования вирусом гриппа в каждой группе проводили эвтаназию 5 мышей и в стерильных условиях извлекали лёгкие. После трехкратной промывки в растворе 0,01 М ФСБ лёгкие гомогенизировали и ресуспендировали в 1 мл холодного стерильного ФСБ. Суспензию осветляли от клеточного дебриса центрифугированием при 2000g в течение 10 мин, супернатант использовали для определения инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK.

Для определения инфекционного титра вируса клетки MDCK рассаживали в 96-луночных планшетах со средней плотностью 30–35 тыс. клеток на лунку и выращивали в минимальной среде Игла (MEM) в присутствии 5% фетальной сыворотки теллят, 10 мМ глутамин и антибиотиков (пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) до полного монослоя. Перед заражением вирусом клетки 2 раза промывали средой MEM без сыворотки. Готовили 10-кратные разведения каждой пробы вируса из лёгких (цельный до 10-8) на среде с добавлением ТРСК-трипсин (2 мкг/мл).

Полученными разведениями заражали монослой 4 лунок 96-луночного планшета. После инкубации при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 ч клетки промывали трижды ФСБ и фиксировали 10% раствора формальдегида при 18–23°C в течение 5 мин. После удаления раствора формальдегида в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл 1% раствора кристаллического фиолетового и выдерживали при 18–23°C в течение 5 мин. После промывания водой и высушивания планшета в лунку добавляли по 0,1 мл 96% спирта, инкубировали при покачивании при комнатной температуре в течение 20 мин, а затем измеряли оптическую плотность при длине волны 570 нм.

Лунки считали положительными, если оптическая плотность в них была меньше оптической плотности в клеточном контроле на 20%. Инфекционный титр вируса определяли по методу Рида и Менча 4 раза в каждой пробе и выражали в log<sub>10</sub> ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл (ТЦИД — тканевая цитопатическая инфекционная доза). Затем рассчитывали среднее значение титра для 3 одинаковых проб.

### Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили с использованием методов описательной статистики. Данные титров специфических антител представлены в виде средних геометрических значений и их доверительных интервалов. Проверку на нормальность распределения значений в группах проводили методом Шапиро–Уилка. В случае отсутствия нормальности распределения ( $p < 0,05$ ) для сравнения использованы непараметрические тесты Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни. При нормальном распределении выборок ( $p \geq 0,05$ ) сравнение проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) и теста Даннета. Для попарного сравнения групп использовали  $t$ -критерий Стьюдента. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты

Исследование ЧВ против гриппа, содержащей КА на основе природного бетулина, включало проведение оценки антиген-специфического гуморального иммунитета, а также оценку протективных свойств вакцины в отношении вируса гриппа А/Калифорния/04/09 (H1N1) на модели гриппозной пневмонии в опытах на животных.

#### Оценка антиген-специфического гуморального иммунитета

Все животные до иммунизации не имели определяемых уровней специфических антител ни в одном из проводимых тестов.

Результаты оценки средних геометрических титров антигемагглютинирующих антител при имму-

низации мышей исследуемыми образцами представлены в **табл. 1**. Показано, что в группе контрольных животных, которым вместо препаратов вакцины был введен раствор плацебо, антитела отсутствовали.

В группе, иммунизированной ЧВ с КА, наблюдалось образование антител в отношении всех четырех вирусов гриппа А и В, входящих в состав вакцины (**табл. 1**). Средние титры антител в реакции торможения геагглютинации были выше, чем 1 : 40, в отношении всех тестируемых вирусов гриппа, при этом титры в отношении вирусов гриппа В были ниже, чем в отношении вирусов гриппа А. При введении моновалентной вакцины А/Калифорния/07/09 (H1N1), а также антигенов вирусов гриппа А H3N2 и вирусов гриппа В наблюдалось образование антител в средних титрах выше, чем 1 : 40, к соответствующим вирусам. Как и при использовании ЧВ, титры в отношении вирусов гриппа В были ниже, чем в отношении вирусов гриппа А. Наибольшая антигенная активность после 1-й иммунизации наблюдалась в отношении вируса гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1).

Вторая иммунизация была проведена через 14 сут после первой. Сыворотки крови от 6 животных из каждой группы были получены на 14-е сутки после 2-й иммунизации. Весь период после 2-й иммунизации также проводилось наблюдение за животными, при этом ни в одной из групп не было выявлено отклонений в поведении животных, признаков заболевания у них, а также гибели мышей. В 6-й группе не было прироста антител. В остальных группах наблюдалось образование антител в отношении соответствующих вирусов, при этом

**Таблица 1.** Иммуногенность ЧВ с КА и её компонентов после 1-й и 2-й иммунизаций мышей (уровень специфических антител к вирусу гриппа у лабораторных животных после иммунизации), среднее геометрическое титров [95% доверительный интервал]

**Table 1.** Immunogenicity of CA-containing QV and its component after the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> immunizations of mice (the level of influenza virus-specific antibodies in laboratory animals after the immunization), geometric mean titers [95% confidence interval]

Группа Group	Штамм вируса гриппа / Influenza virus strain							
	1-я иммунизация / 1 <sup>st</sup> immunization				2-я иммунизация / 2 <sup>nd</sup> immunization			
	H1N1	H3N2	Виктория Victoria	Ямагата Yamagata	H1N1	H3N2	Виктория Victoria	Ямагата Yamagata
1	142,5 [105,9–191,8]	100,8 [69,2–146,7]	56,6 [38,0–84,2]	80,0 [50,5–126,7]	1140,4 [847,4–1534,5]	640,0 [404,0–1013,8]	359,2 [266,9–483,4]*	201,6 [111,3–365,0]*
2	100,8 [69,2–146,7]	–	–	–	806,3 [553,9–1173,9]	–	–	–
3	–	80,0 [50,5–126,7]	–	–	–	403,2 [167,1–972,7]	–	–
4	–	–	44,9 [33,4–60,4]	–	–	–	226,3 [151,9–337,0]	–
5	–	–	–	50,4 [34,6–73,4]	–	–	–	71,3 [34,9–145,7]
6	–	–	–	–	–	–	–	–

**Примечание.** \* $p < 0,05$  по сравнению с соответствующим моновалентом ( $t$ -критерий Стьюдента).

**Note.** \* $p < 0.05$  compared to the respective monovalent vaccine (the Student  $t$ -test).

титр антител после 2-й вакцинации по сравнению с 1-й вакцинацией значительно увеличился, кроме моновалента Ямагата. Как и после 1-й вакцинации, титр антител к вирусам гриппа А был выше, чем титр антител к вирусу гриппа В, при использовании как ЧВ, так и моновалентных компонентов вакцины. Как и после 1-й вакцинации, в крови животных после 2-й вакцинации наиболее высокий прирост титра антител наблюдался к вирусу А/Калифорния/07/09 (H1N1).

#### Оценка протективности вакцины

Гибель мышей в 6-й группе началась на 4-е сутки после заражения, и к 12-м суткам наблюдения погибли все животные (рис. 1). В группах животных, которым был введён КА в дозе 200 и 1000 мкг соответственно, гибель мышей была несколько меньше — 85 и 77%. Протективная активность ЧВ с КА была дозозависимой. Иммунизация 0,1 вакциной дозы обеспечивала 85% выживаемость животных. Иммунизация животных 1 и 5 вакцинными дозами обеспечивала выживаемость всех животных.

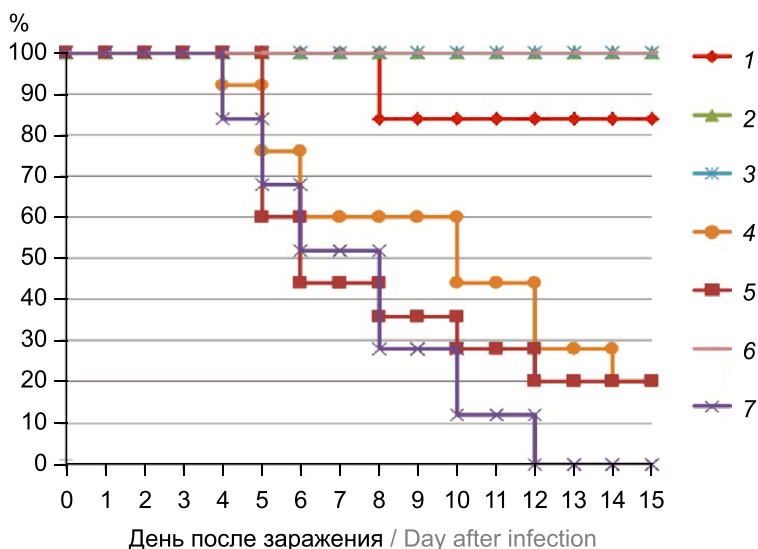
Введение моновалентной вакцины, содержащей антиген вируса гриппа А/Калифорния/04/09 (H1N1) в дозе, эквивалентной содержанию в ЧВ с КА, также защищало от гибели всех инфицированных животных. Данные по смертности в изученных группах полностью коррелировали с данными по изменению массы тела в этих группах (рис. 2). В контрольной невакцинированной группе потеря массы после контрольного заражения была наибольшей и достигала 34,3% на 10-е сутки. В группе

животных, которым был введён КА, потери массы животных были несколько меньшими по сравнению с группой вирусного контроля, но не отличались статистически значимо от неё. В группе животных, иммунизированных 0,1 вакциной дозы, потеря массы была статистически значимо меньше, чем в группе контроля. В остальных группах животных, в которых смертность мышей отсутствовала, потери массы после заражения были незначительны и статистически значимо не отличались от потери массы в группе плацебо.

#### Уровень титра вируса в лёгких мышей

Далее был проанализирован эффект вакцинации ЧВ с КА в различных дозах на титр вируса в лёгких мышей после заражения. Его определяли на 4-е сутки после контрольного заражения. Данные вирусологического изучения лёгких полностью коррелировали с данными по протективной активности изученных образцов (табл. 2).

В контрольной группе невакцинированных животных титр вируса в лёгких был наибольшим и составлял  $5,8 \pm 0,45 \lg \text{ТЦИД}_{50}$ , что свидетельствовало об остром развитии инфекции, которая закончилась гибелью животных. Титр вируса в группах животных, которым вводили только КА, практически не отличался от титра вируса в лёгких животных контрольной группы. Титр вируса в лёгких животных, которым вводили ЧВ с КА, зависел от дозы антигенов и во всех случаях статистически значимо отличался от титра вируса в лёгких животных из группы плацебо. Наибольший

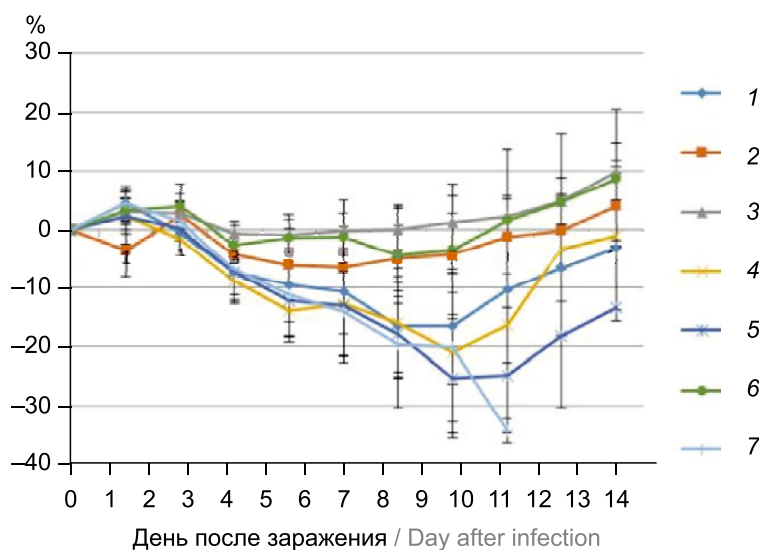


**Рис. 1.** Выживаемость животных, вакцинированных ЧВ против гриппа с КА или КА в различных дозах, после контрольного заражения вирусом гриппа А/Калифорния/04/09 (H1N1).

1 — 0,1 вакциной дозы; 2 — 1 вакцинная доза; 3 — 5 вакцинных доз; 4 — КА, 200 мкг; 5 — КА, 1000 мкг; 6 — моновалентная вакцина H1N1, 5 мкг; 7 — контроль. Во всех случаях  $p < 0,0001$  по сравнению с контролем.

**Fig. 1.** Survival rates in animals vaccinated with the influenza CA-containing QV or with CA at different doses the challenge infection with the influenza A/California/04/09 (H1N1) virus.

1 — 0.1 of the vaccine dose; 2 — 1 vaccine dose; 3 — 5 vaccine doses; 4 — CA, 200 µg; 5 — CA, 1,000 µg; 6 — the monovalent H1N1 vaccine, 5 µg; 7 — control. In all cases,  $p < 0.0001$  compared to the control group.



**Рис. 2.** Изменение массы тела животных, вакцинированных ЧВ против гриппа с КА и её компонентами после контрольного заражения вирусом гриппа А/Калифорния/04/06 (H1N1).

1 — 0,1 вакциной дозы ( $p = 0,391$ ); 2 — 1 вакциной дозы ( $p = 0,00398$ ); 3 — 5 вакцинных доз ( $p = 0,00391$ ); 4 — КА, 200 мкг ( $p = 0,993$ ); 5 — КА, 1000 мкг ( $p = 0,503$ ); 6 — моновалентная вакцина H1N1, 5 мкг ( $p = 0,00398$ ); 7 — контроль.

**Fig. 2.** Changes in the body weight of animals vaccinated with the CA-containing influenza QV and its components after the challenge infection with the influenza A/California/04/06 (H1N1) virus.

1 — 0.1 of the vaccine dose ( $p = 0.391$ ); 2 — 1 vaccine dose ( $p = 0.00398$ ); 3 — 5 vaccine doses ( $p = 0.00391$ ); 4 — CA, 200  $\mu\text{g}$  ( $p = 0.993$ ); 5 — CA, 1000  $\mu\text{g}$  ( $p = 0.503$ ); 6 — monovalent vaccine H1N1, 5  $\mu\text{g}$  ( $p = 0.00398$ ); 7 — control.

**Таблица 2.** Титр вируса в лёгких у животных при вакцинации ЧВ с КА, заражённых вирусом гриппа А/Калифорния/04/09 (H1N1)

**Table 2.** Lung viral titers in animals vaccinated with QV combined with CA and infected with the influenza A/California/04/09 (H1N1) virus

Группа Group	Выживаемость, % Survival rate, %	Титр вируса в лёгких, Ig TCID <sub>50</sub> Lung viral titers, Ig TCID <sub>50</sub>
0,1 вакциной дозы / 0.1 of the vaccine dose	85	4,2 ± 0,45
1 вакциной дозы / 1 vaccine dose	100	2,4 ± 0,89
5 вакцинных доз / 5 vaccine doses	100	1,2 ± 1,09
КА 200 мкг / CA 200 $\mu\text{g}$	15	5,3 ± 0,84
КА 1000 мкг / CA 1000 $\mu\text{g}$	23	5,8 ± 0,27
Моновалентная вакцина H1N1 Monovalent H1N1 vaccine	100	2,4 ± 0,55
Контроль / Control	0	5,8 ± 0,45

титр вируса ( $4,2 \pm 0,45$  Ig TCID<sub>50</sub>) был у животных, иммунизированных 0,1 вакциной дозы, с увеличением дозы вакцины он ожидаемо уменьшался, будучи наименьшим ( $1,2 \pm 1,09$  Ig TCID<sub>50</sub>) в группе животных, иммунизированных 5 вакцинными дозами. При вакцинировании животных монокомпонентом вакцины, содержащим антиген вируса гриппа А/Калифорния/04/09 (H1N1), после контрольного заражения этим же вирусом титр вируса в лёгких животных ( $2,4 \pm 0,55$ ) практически не отличался от титра вируса в группе животных, вакцинированных ЧВ с КА в этой же дозе, и был значительно ниже по сравнению с титром вируса в группе вирусного контроля.

## Обсуждение

Результаты исследования в целом согласуются с опубликованными другими авторами данными о высокой эффективности и безопасности гриппозных вакцин.

В результате проведённых доклинических исследований было показано, что ЧВ с КА обладает высокой протективной активностью, снижая или полностью защищая от смертности животных и уменьшая потерю массы тела по сравнению с группой вирусного контроля после летального заражения, при этом доза вакцины, содержащая по 5 мкг каждого антигена и 200 мкг КА, является достаточной и обеспечивает 100% выживаемость эксперименталь-

ных животных, заражённых вирусом гриппа. Стоит отметить, что эффективность вакцины наблюдается при сниженной антигенной нагрузке, 5 мкг антигена против 15 мкг, используемых в зарегистрированных расщеплённых противогриппозных вакцинах, таких как полимер-субъединичная Гриппол плюс, субъединичная Инфлювак и сплит Ваксигрип [12].

ЧВ с КА во всех изученных дозах значительно снижает титр вируса в лёгких у животных (более 3 lg ТЦИД<sub>50</sub>) после контрольного летального заражения.

Стоит также отметить прогнозируемый благоприятный профиль безопасности, сопоставимый с таковым у зарегистрированных вакцин.

### Заключение

Таким образом, ЧВ с КА на основе бетулина демонстрирует высокую иммуногенность у лабораторных мышей и обеспечивает защиту от летальной пневмонии, вызванной вирусом гриппа А подтипа H1N1. Позитивные результаты доклинического изучения иммуногенности и защитной эффективности в отношении H1N1 инновационной ЧВ против гриппа, содержащей КА, позволяют рекомендовать проведение дальнейших доклинических и клинических исследований вакцины с целью внедрения в практику вакцинопрофилактики.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Семенов Б.Ф., Зверев В.В., Хаитов Р.М. Прогноз развития вакцинопрофилактики в первые десятилетия XXI века. *Педиатрическая фармакология*. 2009; 6(5): 96–106.
2. Bartoszko J.J., McNamara I.F., Aras O.A.Z., Hylton D.A., Zhang Y.B., Malhotra D., et al. Does consecutive influenza vaccination reduce protection against influenza: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2018; 36(24): 3434–44. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.049>
3. Sakala I.G., Honda-Okubo Y., Fung J., Petrovsky N. Influenza immunization during pregnancy: Benefits for mother and infant. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12(12): 3065–71. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1215392>
4. Szilagyi P.G., Fairbrother G., Griffin M.R., Hornung R.W., Donauer S., Morrow A., et al. Influenza vaccine effectiveness among children 6 to 59 months of age during 2 influenza seasons: a case-cohort study. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 2008; 162(10): 943–51. <https://doi.org/10.1001/archpedi.162.10.943>
5. Tisa V., Barberis I., Faccio V., Paganino C., Trucchi C., Martini M., et al. Quadrivalent influenza vaccine: a new opportunity to reduce the influenza burden. *J. Prev. Med. Hyg.* 2016; 57(1): E28–33.
6. Ambrose C.S., Levin M.J. The rationale for quadrivalent influenza vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2012; 8(1): 81–8. <https://doi.org/10.4161/hv.8.1.17623>
7. Tregoning J.S., Russell R.F., Kinnear E. Adjuvanted influenza vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2018; 14(3): 550–64. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1215392>
8. Boikos C., Imran M., Nguyen V.H., Ducruet T., Sylvester G.C., Mansi J.A. Effectiveness of the adjuvanted influenza vaccine in older adults at high risk of influenza complications. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(8): 862. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080862>

9. Zhu W., Dong C., Wei L., Wang B.Z. Promising adjuvants and platforms for influenza vaccine development. *Pharmaceutics*. 2021; 13(1): 68. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010068>
10. Nguyen-Contant P., Sangster M.Y., Topham D.J. Squalene-based influenza vaccine adjuvants and their impact on the hemagglutinin-specific B cell response. *Pathogens*. 2021; 10(3): 355. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030355>
11. Tateno M., Stone B.J., Srodulski S.J., Reedy S., Gawriluk T.R., Chambers T.M., et al. Synthetic Biology-derived triterpenes as efficacious immunomodulating adjuvants. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 17090. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73868-6>
12. Красильников И.В., Иванов А.В., Белякова О.В., Николаева А.М., Погодин П.И. Способ получения тетравалентной субъединичной противогриппозной вакцины. Патент РФ № 2740751 C1; 2021.

### REFERENCES

1. Semenov B.F., Zverev V.V., Khaitov R.M. The forecast of the development of vaccination in the first decades of the XXI century. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2009; 6(5): 96–106. (in Russian)
2. Bartoszko J.J., McNamara I.F., Aras O.A.Z., Hylton D.A., Zhang Y.B., Malhotra D., et al. Does consecutive influenza vaccination reduce protection against influenza: a systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2018; 36(24): 3434–44. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.049>
3. Sakala I.G., Honda-Okubo Y., Fung J., Petrovsky N. Influenza immunization during pregnancy: Benefits for mother and infant. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12(12): 3065–71. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1215392>
4. Szilagyi P.G., Fairbrother G., Griffin M.R., Hornung R.W., Donauer S., Morrow A., et al. Influenza vaccine effectiveness among children 6 to 59 months of age during 2 influenza seasons: a case-cohort study. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 2008; 162(10): 943–51. <https://doi.org/10.1001/archpedi.162.10.943>
5. Tisa V., Barberis I., Faccio V., Paganino C., Trucchi C., Martini M., et al. Quadrivalent influenza vaccine: a new opportunity to reduce the influenza burden. *J. Prev. Med. Hyg.* 2016; 57(1): E28–33.
6. Ambrose C.S., Levin M.J. The rationale for quadrivalent influenza vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2012; 8(1): 81–8. <https://doi.org/10.4161/hv.8.1.17623>
7. Tregoning J.S., Russell R.F., Kinnear E. Adjuvanted influenza vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2018; 14(3): 550–64. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1215392>
8. Boikos C., Imran M., Nguyen V.H., Ducruet T., Sylvester G.C., Mansi J.A. Effectiveness of the adjuvanted influenza vaccine in older adults at high risk of influenza complications. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(8): 862. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080862>
9. Zhu W., Dong C., Wei L., Wang B.Z. Promising adjuvants and platforms for influenza vaccine development. *Pharmaceutics*. 2021; 13(1): 68. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010068>
10. Nguyen-Contant P., Sangster M.Y., Topham D.J. Squalene-based influenza vaccine adjuvants and their impact on the hemagglutinin-specific B cell response. *Pathogens*. 2021; 10(3): 355. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030355>
11. Tateno M., Stone B.J., Srodulski S.J., Reedy S., Gawriluk T.R., Chambers T.M., et al. Synthetic Biology-derived triterpenes as efficacious immunomodulating adjuvants. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 17090. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73868-6>
12. Krasil'nikov I.V., Ivanov A.V., Belyakova O.V., Nikolaeva A.M., Pogodin P.I. Method of obtaining tetravalent subunit influenza vaccine. Patent RF № 2740751 C1; 2021. (in Russian)



**Информация об авторах**

*Красильников Игорь Викторович*<sup>✉</sup> — д.б.н., директор по науке ООО «Развитие биотехнологий», Москва, Россия, [kiv06@mail.ru](mailto:kiv06@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-5048-7828>

*Иванов Александр Викторович* — к.фарм.н., ведущий технолог ООО «Развитие биотехнологий», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7608-1914>

*Николаева Алевтина Максимовна* — д.б.н., научный консультант ООО «Развитие биотехнологий», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>

*Белякова Ольга Валерьевна* — к.фарм.н., с.н.с. ООО «Развитие биотехнологий», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6352-9380>

*Шевченко Евгений Константинович* — к.б.н., руководитель инновационного отдела ООО «Развитие биотехнологий», Москва, Россия

*Михайлова Наталья Александровна* — д.м.н., профессор, руководитель научного направления по иммунобиотехнологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6652-2093>.

*Ленева Ирина Анатольевна* — д.б.н., зав. лаб. экспериментальной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

*Зверев Виталий Васильевич* — д.б.н., профессор, академик РАН, главный научный руководитель НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 22.02.2022;  
принята к публикации 02.06.2022;  
опубликована 30.06.2022

**Information about the authors**

*Igor V. Krasilnikov*<sup>✉</sup> — D. Sci (Biol.), Head of R&D, Razvitie BioTechnology, Moscow, Russia, [kiv06@mail.ru](mailto:kiv06@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-5048-7828>

*Aleksandr V. Ivanov* — Cand. Sci. (Pharm.), leader technologist, Razvitie BioTechnology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7608-1914>

*Alevtina M. Nikolaeva* — D. Sci.(Biol.), scientific consultant, Razvitie BioTechnology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>

*Olga V. Belyakova* — Cand. Sci. (Pharm.), senior scientist, Razvitie BioTechnology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6352-9380>

*Evgeny K. Shevchenko* — Cand. Sci. (Biol.), Head, Innovation department, Razvitie BioTechnology, Moscow, Russia

*Nataliya A. Mikhailova* — D. Sci (Med.), Prof., Head, Scientific direction in immunobiotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6652-2093>

*Irina A. Leneva* — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of experimental virology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

*Vitaly V. Zverev* — D. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, General Head, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 22.02.2022;  
accepted for publication 02.06.2022;  
published 30.06.2022