

УДК 578.7

Влияние адъювантов различных групп на иммуногенные свойства кандидатных вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом

© 2020 С. С. КУРАШОВА^{1,*}, Т. К. ДЗАГУРОВА¹, М. С. ЕГОРОВА¹, М. В. БАЛОВНЕВА¹, А. А. ИШМУХАМЕТОВ^{1,2}, А. А. МАРКИНА³, П. Г. АПАРИН³, В. Л. ЛЬВОВ³, Е. А. ТКАЧЕНКО^{1,2}

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», Москва, 108819

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991

³ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, 115478

*e-mail: svetlanak886@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.11.2019 г.

После доработки 28.12.2019 г.

Принята к публикации 27.03.2020 г.

С целью усиления иммуногенности инактивированных вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом исследовано влияние адъювантов разных классов (гидроокись алюминия, сферические белковые частицы, термолабильный белок В, низкоэндоотоксичный апирогенный липополисахарид) в составе моновалентной вакцины на основе вируса Пуумала и поливалентной вакцины на основе вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи на модели мышей BALB/c. В результате исследований установлено, что низкоэндоотоксичный липополисахарид стимулировал продукцию вируснейтрализующих антител и повышал стабильность вакцины при хранении, что позволяет снизить антигенную нагрузку в вакцине. Гидроокись алюминия не влияла на индукцию нейтрализующих антител и стабильность вакцины и незначительно усиливала выработку медиаторов клеточного иммунного ответа. Сферические белковые частицы и термолабильный белок, несмотря на иммуoadъювантный эффект, неприемлемы для вакцин, вводимым людям, ввиду высокой белковой нагрузки и проявлений токсичности соответственно.

Ключевые слова: хантавирусы, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, инактивированные вакцины, адъюванты, иммунный ответ

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-74-85

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – вирусный нетрансмиссивный зооноз, вызываемый вирусами семейства *Hantaviridae* (порядок *Bunyavirales*), – широко распространена на территории Евразии, а в России занимает ведущее место среди природно-очаговых болезней человека [1]. Более 97% случаев ГЛПС в Российской Федерации обусловлены хантавирусом Пуумала и около 3% случаев – антигенно близкородственными хантавирусами Хантаан,

Амур, Сеул и Сочи [2, 3]. До сих пор нет эффективных методов этиотропного лечения хантавирусных инфекций. В Корее и Китае успешно применяются моновалентные и бивалентные инактивированные вакцины, разработанные на основе вирусов Хантаан и Сеул, размноженных в мозговой ткани мышей-сосунков, а также в первичной культуре клеток почек монгольской песчанки и в клетках линии Vero [4–8]. Ни одна из вакцин против ГЛПС не зарегистрирована для примене-

Список сокращений: ГЛПС – геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, ФОЕ – фокусобразующая единица; РН/ФОЕ – реакция нейтрализации фокусобразующих единиц; ПУУ – Пуумала ортохантавирус; ХТН – Хантаан ортохантавирус; Сочи – геновариант ортохантавируса Добрава/Белград; СЧ – сферические частицы; ТЛВ – термолабильный белок В; ЛПС – низкоэндоотоксичный липополисахарид; ФР – физиологический раствор натрия хлорида; нАТ – нейтрализующие антитела; ИЛ – интерлейкин; ИНФ-γ – интерферон-гамма.

ния в странах Евросоюза. В США разработаны ДНК-вакцины, которые наряду с достоинствами характеризуются недостаточной иммуногенностью [9, 10] и трудностями, связанными со способом введения вакцины [11, 12]. В России разработаны лабораторные технологии производства инактивированных вакцин на основе эпидемиологически значимых штаммов вирусов: моновалентная на основе вируса Пуумала, двухкомпонентная вакцина на основе вирусов Пуумала и Куркино [13, 14] и трехвалентная вакцина на основе вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи, которая успешно прошла доклинические испытания [15].

Как известно, к недостаткам инактивированных вакцин, по сравнению с живыми вакцинами, относится недостаточно выраженный или непродолжительный иммунный ответ, что предполагает ревакцинацию через определенный для каждой вакцины срок. Для усиления иммунного ответа применяют адьюванты, представляющие собой гетерогенную по химическому составу и механизму действия группу соединений [16]. Традиционно наиболее часто в составе инактивированных вакцин присутствует гидроокись алюминия [17], представляющая класс минеральных адьювантов.

Целью данного исследования было сравнение иммуногенности вакцинных препаратов – кандидатных вакцин против ГЛПС – с применением адьювантов различных типов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Вакцинные препараты

ВАК-ПУУ – инактивированная концентрированная очищенная вакцина на основе вируса Пуумала (штамм PUU-TKD/VERO), которая содержит $(6,91 \pm 0,4) \cdot 10^4$ копий/мл вирусной РНК.

ГЛПС-Вак – инактивированная концентрированная очищенная вакцина на основе вирусов Пуумала (штамм PUU-TKD/VERO), Хантаан (штамм HTN-P88/VERO), Сочи (геновариант Добрава/Белград; штамм DOB-SOCHI/VERO) с содержанием $(6,91 \pm 0,4) \cdot 10^4$, $(9,53 \pm 0,17) \cdot 10^4$, $(6,21 \pm 0,3) \cdot 10^4$ копий РНК/мл соответственно.

Адьюванты

В качестве потенциальных адьювантов исследовано четыре препарата.

1) Сферические частицы (СЧ), образованные в результате термического ремоделирования вируса табачной мозаики, лишены РНК и состоят из денатурированных субъединиц вирусного белка оболочки [18].

2) Термолабильный белок В (ТЛВ) представляет собой рекомбинантный белок энтеротоксигенной *Escherichia coli*, очищенный с помощью аффинной хроматографии [19].

3) Низкоэндоотоксичный апирогенный липополисахарид, содержащий триацильный липид А и длинный (не менее 15 повторяющихся звеньев) О-полисахарид (ЛПС), полученный из оболочки *Shigella sonnei* [20]. Препарат предоставлен ООО «Гритвак» (Россия).

4) Гидроокись алюминия (Al).

Иммунизация животных

Эксперименты по оценке иммуногенности вакцин против ГЛПС с разными группами адьювантов выполнены на клинически здоровых половозрелых мышах-самках линии BALB/c массой тела 18–20 г на начало исследования находившихся в одинаковых условиях содержания и кормления. Исследования на животных проводили в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой в Страсбурге 18.03.1986 и подтвержденной в 15.06.2006 (ETS N 123; [https://www.coe.int/t/e/legal_affairs/legal_cooperation/biological_safety_and_use_of_animals/laboratory_animals/GT123\(2002\)63%20E%20PART%20B%20Ferrets%20rev2.pdf](https://www.coe.int/t/e/legal_affairs/legal_cooperation/biological_safety_and_use_of_animals/laboratory_animals/GT123(2002)63%20E%20PART%20B%20Ferrets%20rev2.pdf)); правила лабораторной практики (<http://docs.cntd.ru/document/1200101144>, <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>).

Животные поступали из филиала «Андреевка» Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства. Животным опытных групп вводили исследуемый препарат в дозе 0,5 мл (0,5 дозы) готовой формы вакцины трехкратно внутримышечно с двухнедельными интервалами (проведено три серии экспериментов в идентичных дозах). Животным контрольной группы вводили в том же объеме физиологический раствор натрия хлорида (ФР) с соответствующими адьювантами. Забор крови проводили через 14 сут после третьей иммунизации. Животных выводили из эксперимента помещением в CO₂-камеру с последующим обескровливанием методом декапитации.

Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены рандомизированно на группы по 7 мышей.

Экспериментальные группы (в скобках указана концентрация соответствующего адьюванта): 1 – ВАК-ПУУ, 2 – ВАК-ПУУ-А1 (1 мг/мл), 3 – ВАК-ПУУ-СЧ/150 (150 мкг/мл), 4 – ВАК-ПУУ-СЧ/300

(300 мкг/мл), 5 – ВАК-ПУУ-ТЛВ/0,2 (0,2 мкг/мл), 6 – ВАК-ПУУ-ТЛВ/7,5 (7,5 мкг/мл), 7 – ВАК-ПУУ-ЛПС (50 мкг/мл).

Контрольные группы: К-ФР, К-А1, К-ЛПС, К-СЧ/150, К-СЧ/300, К-ЛПС, К-ТЛВ/0,2 и К-ТЛВ/7,5.

В вакцинные препараты в неразведенном виде (н/р) и в разведениях 1/2, 1/4 и 1/8 добавляли исследуемые адъюванты и вводили внутримышечно. Вне зависимости от разведения вакцинного препарата концентрации адъювантов не менялись.

Сыворотки крови мышей, собранные через две недели после третьей иммунизации, прогревали при 56 °С в течение 30 мин и хранили до исследования при 6 ± 2 °С.

Определение вируснейтрализующих антител

Нейтрализующие антитела (НАТ) определяли в реакции нейтрализации (РН) по подавлению фокусобразующих единиц (ФОЕ) в культуре клеток Vero E6, описанной ранее [21]. За титр НАТ принимали разведение сыворотки, подавляющее 50% ФОЕ, выявленных в контрольном образце вируса. Каждая проба сыворотки крови трижды исследована в РН/ФОЕ₅₀. Критерием достаточной иммуногенности (предел отсечения) считали наличие в сыворотке крови экспериментальных животных НАТ в титре $\geq 4,32 \log_2$.

Анализ цитокинов

Уровень цитокинов: интерлейкина (ИЛ)-1 β , ИЛ-12, интерферона-гамма (ИНФ- γ) – в сыворотках крови мышей BALB/c определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов ELISA kits (Cusabio, WuhanHuamei, BiotecCo. Ltd, Китай), согласно инструкциям производителей.

Статистический анализ

Полученные результаты (совокупные данные трех независимых экспериментов) анализировали в программе GraphPad Prism 8.2.0. Статистическую значимость различий определяли с помощью одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюка и Даннетта: ns – не значима, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$. Полученные результаты представлены в виде среднегеометрических значений титра НАТ в двоичных логарифмах. Количественное определение цитокинов проводили с помощью программного обеспечения CurveExpert.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для подбора вакцинной дозы аликвоты моновалентных полуфабрикатов ВАК-ПУУ, ВАК-ХТН и

ВАК-Сочи были раститрованы с последующей индикацией вируса по числу ФОЕ/мл, а также по числу копий вирусной РНК/мл до и после инактивирования вируса. Мышей BALB/c иммунизировали вакцинными препаратами в разведениях от 0 (н/р) до 1/256. Титры НАТ, полученные в результате иммунизации, были соотнесены со специфичностью вакцины, которую рассчитывали по числу копий вирусной РНК/мл. За дозу (1 мл) вакцины принимали число копий РНК/мл, способное вызвать выработку НАТ у 100% мышей BALB/c в титре $\geq 4,32 \log_2$ при хранении вакцины в течение двух лет.

В соответствии с этими критериями оптимальная по иммуногенности доза вакцины ВАК-ПУУ составила $6,91 \cdot 10^4$ РНК-копий/мл, что соответствовало разведению 1/8 исходного вакцинного полуфабриката, при котором индукция НАТ наблюдалась у 100% мышей в диапазоне от $(5,39 \pm 0,1)$ до $(4,35 \pm 0,1) \log_2$ с учетом хранения (табл. 1). Оптимальная доза вакцины ВАК-ХТН составила $9,53 \cdot 10^4$ РНК-копий/мл, что соответствовало разведению 1/16 исходного вакцинного полуфабриката, при котором индукция НАТ у 100% мышей была в диапазоне от $(5,2 \pm 0,2)$ до $(4,5 \pm 0,1) \log_2$ за тот же период. Вакцинная доза для ВАК-Сочи составила $6,21 \cdot 10^4$ РНК-копий/мл, что соответствовало разведению исходного вакцинного полуфабриката 1/8, индуцирующего выработку НАТ у 100% мышей в диапазоне от $(5,09 \pm 0,17)$ до $(4,38 \pm 0,1) \log_2$.

Влияние адъювантов в составе вакцины ВАК-ПУУ на специфический иммунный ответ

Нейтрализующие антитела были выявлены у 7/7 мышей во всех экспериментальных группах в ответ на введение испытуемых вакцинных препаратов (экспериментальные группы 1–7) до разведения 1/8 включительно. В контрольных группах НАТ не выявлены. У мышей экспериментальных групп НАТ до иммунизации в сыворотках крови отсутствовали.

При введении неразведенных вакцинных препаратов более выраженный иммунный ответ в сравнении с ВАК-ПУУ (группа сравнения) с соответствующей статистической разницей в титре НАТ выявлен в сыворотках крови мышей после иммунизации ВАК-ПУУ-СЧ/300 ($p < 0,0001$), ВАК-ПУУ-ТЛВ/0,2 ($p < 0,001$), ВАК-ПУУ-ЛПС ($p < 0,0001$), ВАК-ПУУ-А1 ($p = 0,001$) (рис. 1).

При введении вакцинных препаратов в разведениях 1/2, 1/4 и 1/8 не наблюдалось достоверной разницы в титре НАТ в группах ВАК-ПУУ-СЧ/150 и ВАК-ПУУ-А1, а в группе ВАК-ПУУ-ТЛВ/7,5 титр НАТ снижался статистически значимо ($p > 0,0001$) относительно ВАК-ПУУ (рис. 1). Введение вакцин, содержащих ТЛВ в концентрации 7,5 мкг/мл,

Подбор оптимальной дозы вакцины ВАК-ПУУ для индукции специфического иммунного ответа у мышей BALB/c

Selection of optimal VAC-PUU dose for inducing specific immune response in BALB/c mice

Разведение	Эффективность иммунизации, % ^a	Титр вируса, ФОЕ/мл ^b	Число копий РНК/мл ^c	Титр нАТ, log ₂ ^d			
				2 нед	6 мес	12 мес	24 мес
0	100	5,50	4,00·10 ⁵	8,67±0,18	8,20±0,08	5,40±0,19	4,90±0,17
1/2	100	5,30	1,24·10 ⁵	6,40±0,10	5,44±0,17	5,00±0,32	4,53±0,10
1/4	100	5,05	1,03·10 ⁵	5,60±0,27	5,36±0,32	4,74±0,21	4,47±0,20
1/8	100	4,87	6,91·10 ⁴	5,39±0,10	5,15±0,10	4,49±0,28	4,35±0,10
1/16	100	4,60	3,67·10 ⁴	4,90±0,10	4,77±0,18	4,40±0,15	4,10±0,08
1/32	100	4,45	3,55·10 ⁴	4,50±0,10	4,45±0,21	4,20±0,07	<4
1/64	100	3,87	7,46·10 ³	4,26±0,17	4,10±0,12	<4	<4
1/128	93	3,70	3,27·10 ³	<4	<4	<4	<4
1/256	78	3,50	3,12·10 ³	<4	<4	<4	<4

^aПроцентное содержание мышей с выраженными титрами нАТ относительно всех иммунизированных мышей (The percentage of mice with high titers of neutralizing antibodies (NAb) relative to all immunized mice).

^bТитр вируса в вакцинном полуфабрикате до инактивации (The virus titer in vaccine preparation before inactivation).

^cЧисло копий РНК в вакцинном полуфабрикате после инактивации (The number of copies of RNA in the vaccine preparation after inactivation).

^dТитр нАТ в ответ на иммунизацию вакцинными препаратами, хранившихся в одинаковых условиях 2 недели, 6, 12 и 24 месяца (The titer of NAb in response to immunization with vaccines stored under identical conditions for 2 weeks, 6, 12 or 24 months).

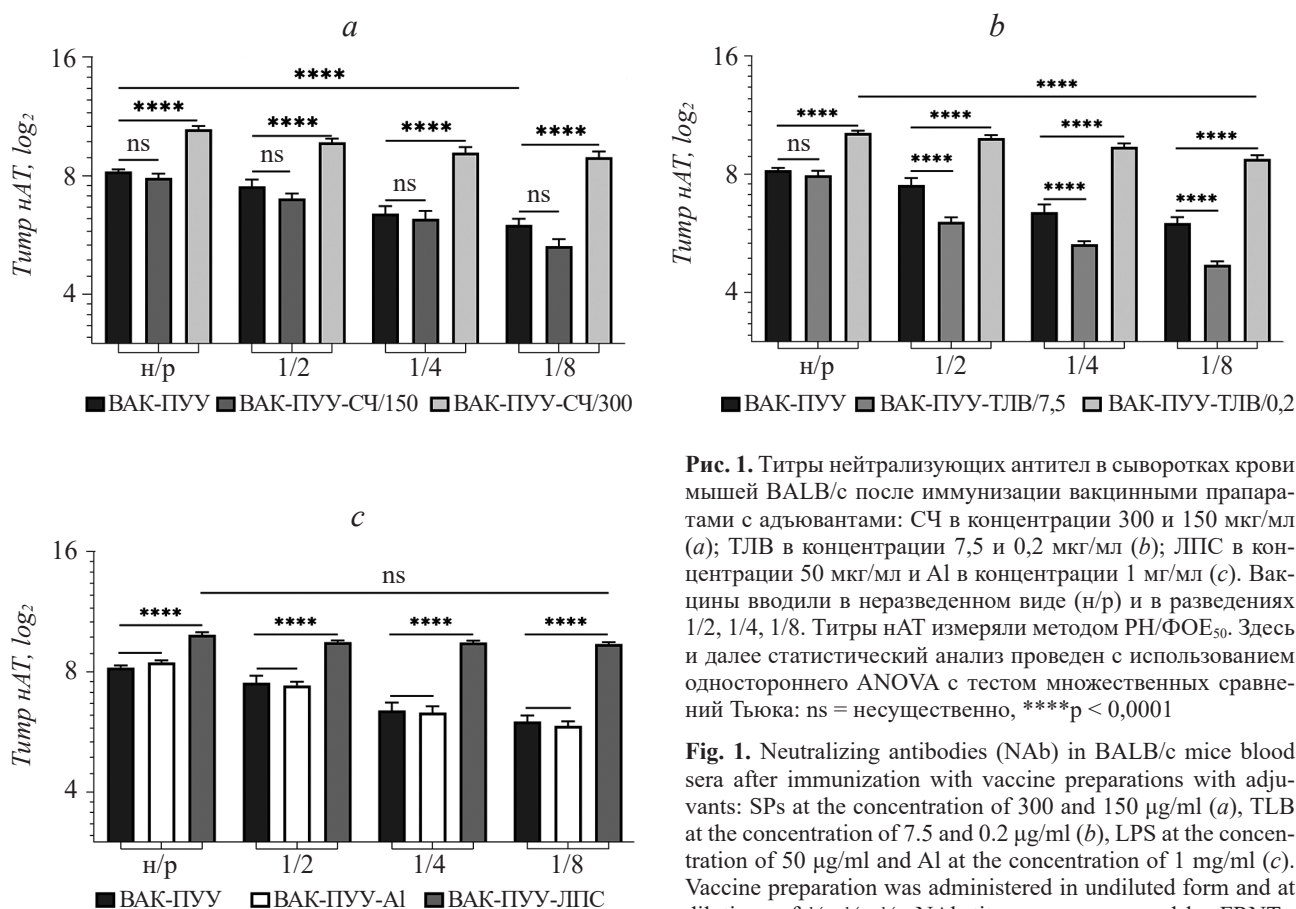


Рис. 1. Титры нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей BALB/c после иммунизации вакцинными препаратами с адьювантами: СЧ в концентрации 300 и 150 мкг/мл (a); ТЛВ в концентрации 7,5 и 0,2 мкг/мл (b); ЛПС в концентрации 50 мкг/мл и АІ в концентрации 1 мг/мл (c). Вакцины вводили в неразведенном виде (н/р) и в разведениях 1/2, 1/4, 1/8. Титры нАТ измеряли методом РН/ФОЕ₅₀. Здесь и далее статистический анализ проведен с использованием одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюка: ns = незначительно, ****p < 0,0001

Fig. 1. Neutralizing antibodies (NAb) in BALB/c mice blood sera after immunization with vaccine preparations with adjuvants: SPs at the concentration of 300 and 150 µg/ml (a), TLB at the concentration of 7.5 and 0.2 µg/ml (b), LPS at the concentration of 50 µg/ml and AI at the concentration of 1 mg/ml (c). Vaccine preparation was administered in undiluted form and at dilutions of 1/2, 1/4, 1/8. NAb titers were measured by FRNT₅₀ method. Hereinafter, a statistical analysis was carried out using a one-way ANOVA with the Tukey multiple comparison test: ns – not significant, ****p < 0.0001.

сопровождалось токсическим эффектом в виде выпадения усов и частично шерстного покрова. При иммунизации вакцинными препаратами уровень нАТ у мышей в группах ВАК-ПУУ-ТЛВ/0,2 ($p < 0,0001$) и ПУУ-СЧ/300 ($p < 0,0001$) снижался при разведении вакцины, но при этом был статистически выше, чем в группе ВАК-ПУУ ($p < 0,0001$) в этих же разведениях (рис. 1*a, b*). Более четко эта тенденция была выражена в группе ВАК-ПУУ-ЛПС (рис. 1*c*). Титр нАТ в сыворотке крови мышей этой группы не снижался при снижении дозы вакцины и оставался на статистически достоверно более высоком уровне, чем у мышей в группе ВАК-ПУУ ($p < 0,0001$).

Таким образом, наиболее выраженный адьювантный эффект наблюдался в группах ВАК-ПУУ-ЛПС, ВАК-ПУУ-СЧ/300 и ВАК-ПУУ-ТЛВ/0,2 ($p < 0,0001$). Важно подчеркнуть, что иммуностимулирующий эффект ЛПС, СЧ/300 и ТЛВ/0,2 не снижался при разведении этих вакцинных препаратов. Однако, принимая во внимание тот факт, что адьювантные свойства СЧ проявлялись лишь при высокой белковой нагрузке (300 мкг/мл), что нежелательно для вакцин, вводимых людям, а введение ТЛВ в составе вакцинного препарата сопровождалось проявлениями токсичности, эти препараты, были исключены из дальнейших исследований.

В последующих экспериментах в качестве адьювантов исследовали А1 и ЛПС в составе вакцины ВАК-ПУУ и поливалентной вакцины ГЛПС-Вак. Вакцинные препараты вводили в неразведенном виде и в разведении 1/8. При анализе иммуногенности поливалентной вакцины ГЛПС-Вак в сравнении с ГЛПС-Вак-А1 не выявлено статистически значимой разницы в титре нАТ в сы-

воротках крови мышей в ответ на иммунизацию вакцинами как в неразведенном виде, так и в разведении 1/8. В группе ГЛПС-Вак-ЛПС титры нАТ были статистически значимо выше, чем в ГЛПС-Вак, снижение дозы антигенной составляющей вакцины в 8 раз не приводило к снижению титра нАТ ($p < 0,0001$) (рис. 2*a, b*).

Влияние адьювантов на иммуногенность ВАК-ПУУ при хранении

Вакцинные препараты ВАК-ПУУ, ВАК-ПУУ-ЛПС хранили при 6 ± 2 °С в жидкой и лиофилизированной формах, а ВАК-ПУУ-А1 только в жидкой форме. Контроль на иммуногенную стабильность был проведен через 6 и 12 месяцев хранения в регламентированных условиях. Вакцинные препараты вводили в неразведенном виде и в разведении 1/8. Титры нАТ определены у 7/7 иммунизированных мышей BALB/c после 3-кратной иммунизации во всех экспериментальных группах. В контрольных группах мышей нАТ не обнаружены. После иммунизации неразведенными вакцинами, хранившимися 6 и 12 месяцев в жидком виде, уровень нАТ незначительно снизился в группах ВАК-ПУУ ($p = 0,01$) и ВАК-ПУУ-А1 ($p < 0,0001$), причем не было значимых различий в титрах нАТ между группами в эти сроки хранения. Уровень нАТ в группе ВАК-ПУУ-ЛПС был значимо выше, чем у мышей в группе сравнения, ВАК-ПУУ, с выраженной статистической разницей ($p < 0,0001$) (рис. 3*a*). Через 12 месяцев хранения между группами ВАК-ПУУ и ВАК-ПУУ-ЛПС разница оказалась значительной ($p < 0,001$). Не отмечено различий в иммуногенности вакцин, хранившихся как в жидкой, так и в лиофилизированной формах в течение 12 месяцев (рис. 3*c, d*).

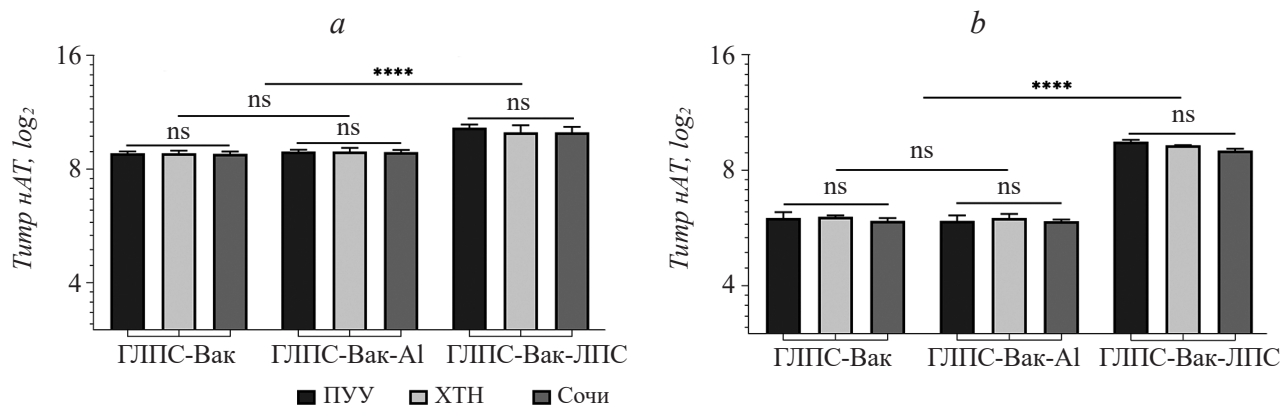


Рис. 2. Титры нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей BALB/c после трехкратной иммунизации вакцинами: ГЛПС-Вак, ГЛПС-Вак-А1, ГЛПС-Вак-ЛПС в неразведенном виде (*a*); в разведении 1/8 (*b*). Титры нАТ определяли методом РН/ФОЕ₅₀. ns – несущественно, **** $p < 0,0001$.

Fig. 2. Titers of NAb in BALB/c mice blood sera after three times immunizations with HFRS-Vac, HFRS-Vac-A1, HFRS-Vac-LPS in undiluted form (*a*) and at dilution of 1/8 (*b*). NAb titers were measured by FRNT₅₀ method. **** $p < 0,0001$.

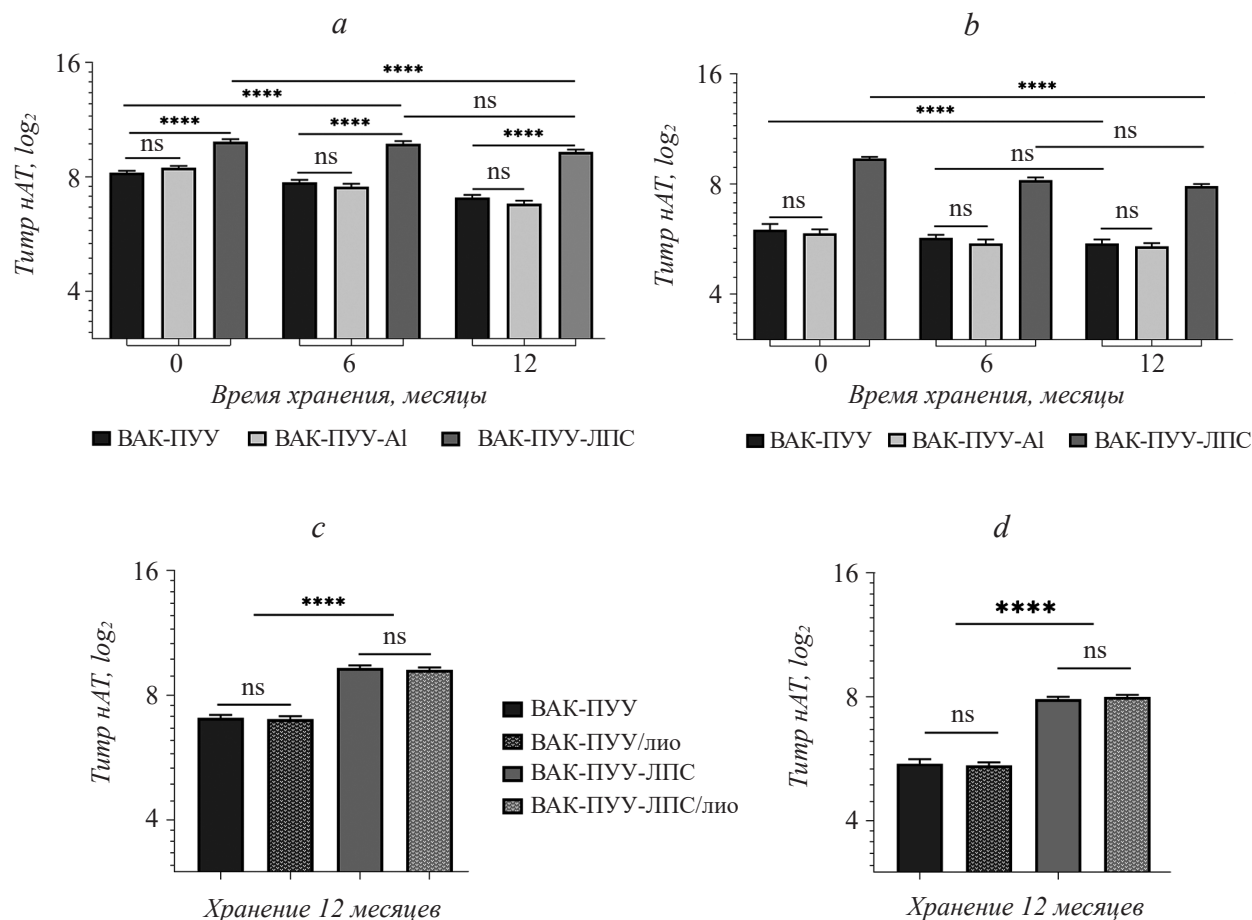


Рис. 3. Анализ нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей BALB/c, иммунизированных вакцинами ВАК-ПУУ, ВАК-ПУУ-А1 и ВАК-ПУУ-ЛПС. Вакцинные препараты хранили в течение 6 и 12 месяцев при температуре 6 ± 2 °С в неразведенном виде в жидкой (а) или лиофилизированной (лио) форме, а также при разведении 1/8 в жидкой (b) или лиофилизированной (d) форме. Титры нАТ определяли методом РН/ФОЕ₅₀. ns – несущественно, **** $p < 0,0001$

Fig. 4. Titers of NAb in BALB/c mice blood sera after three immunizations with VAC-PUU, VAC-PUU-A1 and VAC-PUU-LPS. The vaccines were stored for 6 and 12 months at a 6 ± 2 °C as undiluted preparations in a liquid (a) or lyophilized (b) form as well as when diluted 1/8 in a liquid (c) or lyophilized (d) form. Titers were measured by FRNT₅₀ method. **** $p < 0.0001$.

Влияние адъювантов на иммуногенность поливалентных вакцин при хранении

В результате хранения образцов сывороток крови мышей, иммунизированных поливалентной вакциной ГЛПС-Вак и ГЛПС-Вак-А1, как в неразведенном виде, так и в разведении 1/8, не выявлено значимых различий в титре нАТ к вирусам Пуумала, Хантаан и Сочи (рис. 4а, b). ГЛПС-Вак-ЛПС индуцировала статистически более выраженный гуморальный ответ ($p < 0,0001$) в сравнении с вышеописанными группами (рис. 4а, b).

Форма хранения вакцинных препаратов (лиофилизированная и жидкая) в течение 12 месяцев не повлияла статистически значимо на выработку нАТ у мышей BALB/c.

Оценка Т-клеточного иммунного ответа

Для оценки индукции клеточного иммунного ответа определяли уровень цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-12 и ИНФ- γ в сыворотках крови мышей BALB/c до и после иммунизаций. За фоновый уровень был принят уровень цитокинов у интактных мышей. Иммуномодулирующий эффект адъювантов оценивали для препаратов ВАК-ПУУ, ВАК-ПУУ-А1, ВАК-ПУУ-ЛПС, ВАК-ПУУ-СЧ/150, ВАК-ПУУ-СЧ/300, ВАК-ПУУ-ТЛВ/0,2, ВАК-ПУУ-ТЛВ/7,5 в сравнении с ВАК-ПУУ и контрольными группами животных. Контрольные группы были представлены интактными животными (К), а также К-ФР, К-А1, К-ЛПС, К-СЧ/150, К-СЧ/300, К-ТЛВ/0,2, К-ТЛВ/7,5.

Выявлено значительное повышение уровня ИЛ-1 β в сыворотках крови мышей в группах

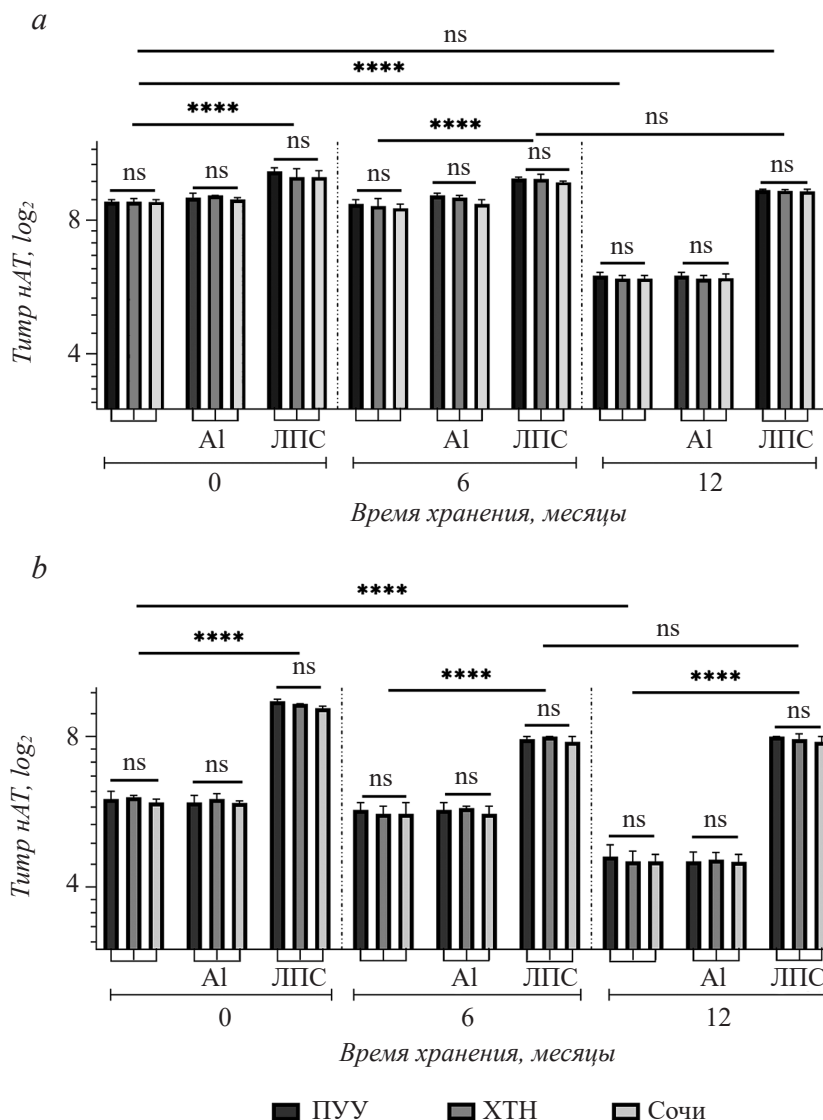


Рис. 4. Анализ нейтрализующих антител к вирусам Пуумала (ПУУ), Хантаан (ХТН) и Сочи в сыворотках крови мышей BALB/c после иммунизации препаратами ГЛПС-Вак без адъювантов и с адъювантами А1 или ЛПС, хранившиеся в течение 6 и 12 месяцев при температуре 6 ± 2 °C в неразведенном виде (a) и в разведении 1/8 (b). Титры нАТ определяли методом РН/ФОЕ₅₀. ns = незначительно, ****p < 0,0001

Fig. 4. Analysis of NABs against Puumala (PUU), Hantaan (HTN) and Sochi viruses in BALB/c mice blood sera after immunization with HFRS-Vac without and with AL or LPS as an adjuvant. Vaccine preparations were stored for 6 and 12 months at 6 ± 2 °C in undiluted (a) or diluted 1/8 (b) form. Titers were measured by FRNT₅₀ method. ****p < 0.0001.

ВАК-ПУУ-ТЛВ/0,2, ВАК-ПУУ-ТЛВ/7,5 (p < 0,0001) и ВАК-ПУУ-СЧ/300 (p < 0,001), а также в контрольных группах К-ТЛВ/0,2, К-ТЛВ/7,5 и К-СЧ/300 (p < 0,0001) после трех иммунизаций относительно группы интактных мышей (рис. 5a, d). В других группах статистически значимой разницы не наблюдалось.

Уровень ИНФ-γ на фоне повышения в контрольных группах К-СЧ/300, К-ТЛВ/0,2 и К-ТЛВ/7,5 относительно интактных мышей (p < 0,0001) был статистически значимо повышен во всех экспериментальных группах (p < 0,0001) (рис. 5b). В группах ВАК-ПУУ-А1 и ВАК-ПУУ-

СЧ/150 (p < 0,0001) эта тенденция была менее выражена (рис. 5e). Следует отметить, что в группе К-ТЛВ уровень цитокинов ИЛ-1β и ИНФ-γ был значимо выше, чем в группе интактных мышей (p < 0,0001), что может свидетельствовать о токсическом воздействии ТЛВ.

Как и в случае ИНФ-γ, уровень ИЛ-12 повышался в сыворотках крови мышей, иммунизированных вакцинами относительно контрольных групп (рис. 5f). В тоже время повышение уровня этого цитокина наблюдалось и в контрольных группах К-СЧ/150, К-СЧ/300 (p < 0,05), К-ТЛВ/0,2 и К-ТЛВ/7,5 (p < 0,0001) (рис. 5c).

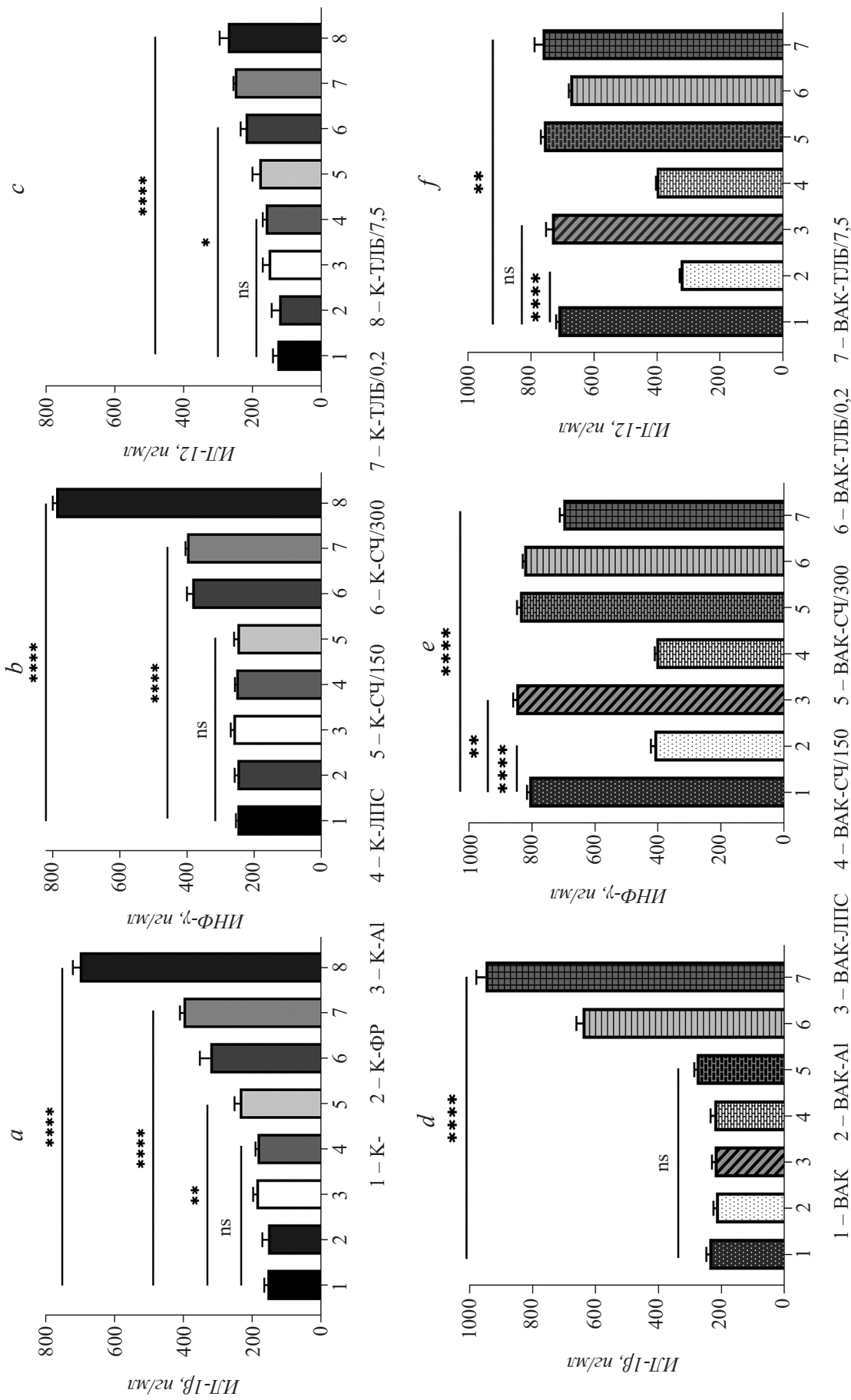


Рис. 5. Анализ уровней ИЛ-1 β (a, d), ИНФ- γ (b, e) и ИЛ-12 (c, f) в сыворотках крови мышей BALB/c, иммунизированных контрольными (a-c) и вакцинными (d-f) препаратами. Статистический анализ проведен с использованием одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Даннетта: ns – незначительно, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Fig. 5. Analysis of IL-1 β (a, d), INF- γ (b, e), IL-12 (c, f) levels in BALB/c mice blood sera immunized with control (a-c) and vaccine (d-f) preparations. Statistical analysis performed using a one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

При сравнительном анализе цитокинового профиля мышей, иммунизированных вакцинами препаратами ВАК-ПУУ, ВАК-ПУУ-А1 и ВАК-ПУУ-ЛПС или препаратами поливалентной вакцины: ГЛПС-Вак, ГЛПС-Вак-А1, ГЛПС-Вак-ЛПС, – хранившимися 6 и 12 месяцев в жидкой и лиофилизированной формах, не выявлено статистически достоверных различий.

Актуальные для России профилактические вакцины против ГЛПС разработаны в «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Это вакцина на основе вируса Пуумала, бивалентная вакцина на основе вирусов Пуумала и Куркино и поливалентная вакцина на основе вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи [13–15].

Как для любой инактивированной вакцины, повышение ее иммуногенности, в том числе с использованием соответствующих адъювантов, чрезвычайно актуально. Введение адъюванта в состав вакцины может способствовать достижению и других целей иммунопрофилактики, таких как снижение дозы антигена, ускорение формирования иммунного ответа, увеличение продолжительности иммунной защиты, повышение эффективности вакцины при введении лицам с ослабленным иммунитетом [22].

Адъювантный эффект может быть обусловлен иммуномодуляцией, оптимизацией процесса презентации антигена, индукцией ответа цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺, таргетингом и формированием депо [23, 24].

В виду большого разнообразия адъювантов и механизма их действия подбор адъюванта осуществляется путем сравнения их эффективности, а также оценки их безопасности и переносимости на моделях животных.

Для хантавирусов, возбудителей ГЛПС, отсутствует лабораторная модель животного для использования в опытах по оценке иммуногенности вакцин методом разрешающей инфекции (challenge). В случаях, когда анализ протективной активности вакцины против соответствующего возбудителя на лабораторных животных невозможен, иммуногенность определяют по иммунному ответу, в первую очередь по уровню индуцируемых вакцинным препаратом нАТ, у иммунизированных животных.

Ранее показано [25], что нАТ к хантавирусам, вырабатываемые на эпитопы поверхностных белков G_n и G_s, видоспецифичны, вследствие чего выработка только нейтрализующих антител исключает возможность перекрестного иммунитета. В то же время для хантавирусов характерна индукция выраженного перекрестного протектив-

ного Т-клеточного иммунитета, индуктором которого является нуклеокапсидный белок N [25]. Оценка иммунологических показателей Т-клеточного иммунитета у лабораторных животных после введения вакцины является важной дополнительной характеристикой иммуногенности вакцины.

В проведенном исследовании в качестве адъювантов были испытаны: СЧ, ТЛВ, ЛПС и гидроокись алюминия в составе вакцинных препаратов против ГЛПС.

СЧ образуют высокоиммуногенные комплексы, адсорбируя на поверхности антигенные детерминанты [18]. В наших экспериментах иммуностимулирующий эффект СЧ наблюдался при содержании их в вакцине не менее 300 мг/дозу. Такое содержание нецелевого белка превышает допустимое в вакцинных препаратах, вводимых людям. Уменьшение концентрации СЧ до допустимых значений белка приводило к снижению иммуногенности до уровня, эквивалентного безадъювантной форме вакцины.

ТЛВ, по данным литературных источников, применяется в качестве молекулярного носителя в бивалентной вакцине для профилактики бруцеллеза и диарей, вызываемых бактериями *Brucella abortus* и энтеропатогенными *Escherichia coli* и *Vibrio cholerae*, в ветеринарии [19]. Введение ТЛВ мышам BALB/c, как в виде монопрепарата, так и в составе вакцины ВАК-ПУУ в рекомендуемой дозе, сопровождалось токсическими проявлениями и повышением уровня провоспалительного цитокина ИЛ-1β. При снижении дозы ТЛВ с 7,5 до 0,2 мкг/мл (ВАК-ПУУ-ТЛВ/0,2) иммуногенность вакцины повышалась относительно ВАК-ПУУ и не наблюдалось видимых токсических проявлений у животных, однако уровень провоспалительного цитокина ИЛ-1β был существенно выше нормы. ИЛ-1β играет важную роль в ранних врожденных иммунных реакциях, а дисрегуляция его экспрессии приводит к аутовоспалению [26–29], в связи с чем повышенная индукция ИЛ-1β при иммунизации вакцинами нежелательна.

С учетом требований, предъявляемым к адъювантам [30], белковые адъюванты СЧ и ТЛВ были исключены из дальнейшего исследования.

Адъюванты на основе алюминия имеют длительную историю применения в вакцинных препаратах по всему миру [17] и входят в состав различных лицензированных препаратов (дифтерийно-коклюшно-столбнячная, дифтерийно-столбнячная, дифтерийно-столбнячно-гепатитная, инактивированная полиомиелитная вакцины) [24]. Нами показано, что использование

алюминия в качестве адъюванта в составе вакцин против ГЛПС не приводит к повышению ее иммуногенности. Известно, что соли алюминия относятся к слабым иммуностимуляторам, особенно клеточного иммунного ответа [24], что и подтверждено в проведенном нами исследовании – по низким уровням цитокинов ИЛ-12 и ИНФ- γ у мышей после иммунизации (рис. 5b, c, e, f).

Углеводные адъюванты модулируют иммунный ответ посредством активации специфических рецепторов врожденной иммунной системы и индукции приобретенного иммунитета [31]. Нами показано, что применение низкоэндоксичного ЛПС в составе моновалентной и поливалентной вакцин против ГЛПС приводит к увеличению титров нАТ при минимальном содержании целевого антигена. Согласно клиническим исследованиям, этот ЛПС безопасен для парентерального введения человеку [32].

Анализ цитокинового профиля у мышей BALB/c показал, что независимо от добавления адъювантов происходит активация эффекторов иммунной системы. Активация иммунного ответа на введение антигена приводит, в частности, к индукции синтеза регуляторных цитокинов ИНФ- γ и ИЛ-12, вследствие чего происходит поляризация иммунного ответа по типу Th-1 [33]. ИЛ-12 обеспечивает регуляторный путь развития врожденной иммунной системы посредством взаимодействий клеток с антигенами и направляет развитие специфического иммунитета по соответствующему фенотипу Т-клеток [34].

В исследовании также рассмотрено влияние на стабильность вакцинных препаратов разных способов и времени их хранения. При длительном хранении (6, 12 и 24 месяца) вакцин без добавления адъювантов наблюдалось снижение индуцируемого уровня гуморального иммунного ответа. Аналогичные результаты получены при использовании гидроксида алюминия – как в составе моновакцины, так и в поливалентной вакцине против ГЛПС. Введение ЛПС в состав этих вакцин позволяет сохранить их иммуногенные свойства в течение 12 месяцев. Форма хранения (в жидком или лиофилизированном виде) не влияла на уровни индуцируемых вакцинами нАТ и цитокинов.

На основании полученных результатов можно говорить о том, что вакцины против ГЛПС: ВАК-ПУУ и ГЛПС-Вак – индуцируют сбалансированный гуморальный и клеточный иммунный ответ у мышей BALB/c, использованных в качестве лабораторной модели. Введение ЛПС в составе этих вакцинных препаратов усиливает и стабилизирует их иммуногенность.

Авторы выражают признательность д.б.н. Карповой О.В. (кафедра вирусологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова), предоставившей для исследований препарат сферических частиц, и д.б.н. Носкову А.Н. (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи) за предоставление препарата В-субъединицы термолabileного энтеротоксина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Ишмухаметов А.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в России: успехи и актуальные проблемы на современном этапе. *Биомедицина XXI века: достижения и перспективные направления развития. Сб. научных трудов*, 2016, 331–344.
2. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Бернштейн А.Д. и др. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (история, проблемы и перспективы изучения). *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*, 2016, 15(3), 23–34. doi: 10.31631/2073-3046-2016-15-3-23-34
3. Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К., Морозов В.Г. и др. Характеристика хантавирусов – возбудителей зоонозных геморрагических лихорадок. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*, 2017, 16(3), 26–32. doi: 10.31631/2073-3046-2017-16-3-26-32
4. Choi, Y., Ahn, C.J., Seong, K.M., et al. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. *Vaccine*, 2003, 21(17-18), 1867–1873. doi: 10.1016/S0264-410X(03)00005-7
5. Chu, Y.K., Jennings G.B., Schmaljohn C.S., et al. A vaccinia virus-vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus. *J. Virol.*, 1995, 69(10), 6417–6423.
6. Krüger D. H., Ulrich R., Lundkvist Å., et al. Hantavirus infections and their prevention. *Microbes Infect.*, 2001, 3(13), 1129–1144. doi: 10.1016/S1286-4579(01)01474-5
7. Cho H.W., Howard C.R., et al. Antibody responses in humans to an inactivated hantavirus vaccine (Hantavax®). *Vaccine*, 1999, 17(20-21), 2569–2575. doi: 10.1016/S0264-410X(99)00057-2
8. Hooper J. W., Li D. Vaccines against hantaviruses. In: *Hantaviruses*, Eds C.S. Schmaljohn & S.T. Nichol, Heidelberg, Berlin: Springer, 2001, 171–191. doi: 10.1007/978-3-642-56753-7_10
9. Boudreau E.F., Josleyn M., Hooper J.W., et al. A phase 1 clinical trial of Hantaan virus and Puumala virus M-segment DNA vaccines for hemorrhagic fever with renal syndrome. *Vaccine*, 2012, 30(11), 1951–1958. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.01.024

10. Jiang D.B., Zhang J.P., Cheng L.F., et al. Hantavirus G_c induces long-term immune protection via lamp-targeting DNA vaccine strategy. *Antiviral Res.*, 2018, 150, 174–182. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.12.011
11. Spik K.W., Badger C., Mathiessen I., et al. Mixing of M segment DNA vaccines to Hantaan virus and Puumala virus reduces their immunogenicity in hamsters. *Vaccine*, 2008, 26(40), 5177–5181. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.03.097
12. Li L., Saade F., Petrovsky N. The future of human DNA vaccines. *J. Biotechnol.*, 2012, 162(2-3), 171–182. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.08.012
13. Бархалева О.А., Воробьева М.С., Ладыженская И.П. и др. Вакцина против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, 2011, 1(41), 27–30.
14. Ткаченко Е.А., Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К. и др. Разработка экспериментально-промышленной технологии производства вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Ремедиум*, 2015, 6, 47–53.
15. Синюгина А.А., Дзагурова Т.К., Ишмухаметов А.А. и др. Доклинические исследования поливалентной вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*, 2019, 18(4), 52–58. doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-52-58
16. Ciabattini A., Pettini E., Fiorino F., et al. Modulation of primary immune response by different vaccine adjuvants. *Front. Immunol.*, 2016, 7, 427. doi: 10.3389/fimmu.2016.00427
17. Savelkoul H.F., Ferro V.A., Strioga M.M., et al. Choice and design of adjuvants for parenteral and mucosal vaccines. *Vaccines*, 2015, 3(1), 148–171. doi: 10.3390/vaccines3010148
18. Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., et al. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens. *J. Gen. Virol.*, 2012, 93(2), 400–407. doi: 10.1099/vir.0.036293-0
19. Clements J.D., Hartzog N.M., Lyon F.L., et al. Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine*, 1988, 6(3), 269–277. doi: 10.1016/0264-410X(88)90223-X
20. Маркина А.А. Липополисахаридная кандидат-вакцина для профилактики эндотоксического и септического шока: автореф. дис. канд. биол. наук, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, 2013.
21. Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Башкирцев В.Н. и др. Выделение и идентификация штаммов хантавирусов – возбудителей ГЛПС в Европейской части России. *Инфекция и иммунитет*, 2012, 2(1–2), 137–138.
22. Vogel F.R. Improving vaccine performance with adjuvants. *Clin. Infect. Dis.*, 2000, 30(Supplement 3), S266–S270. doi: 10.1086/313883
23. McKee A.S., Munks M.W., MacLeod M.K., et al. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J. Immunol.*, 2009, 183(7), 4403–4414. doi: 10.4049/jimmunol.0900164
24. McKee A.S., Marrack P. Old and new adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.*, 2017, 47, 44–51. doi: 10.1016/j.coi.2017.06.005
25. Wang K., Ma H., Liu H., et al. The glycoprotein and nucleocapsid protein of hantaviruses manipulate autophagy flux to restrain host innate immune responses. *Cell Rep.*, 2019, 27(7), 2075–2091. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.061
26. Palomo J., Dietrich D., Martin P., et al. The interleukin (IL)-1 cytokine family – balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine*, 2015, 76(1), 25–37. doi: 10.1016/j.cyto.2015.06.017
27. Fillman S.G., Cloonan N., Catts V.S., et al. Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Mol. Psychiatry*, 2013, 18(2), 206. doi: 10.1038/mp.2012.110
28. Maedler K., Sergeev P., Ris F., et al. Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest.*, 2002, 110(6), 851–860. doi: 10.1172/JCI15318
29. Veerdonk F.V.D., Netea M. New insights in the immunobiology of IL-1 family members. *Front. Immunol.*, 2013, 4, 167. doi: 10.3389/fimmu.2013.00167
30. Gupta R.K., Siber G.R. Adjuvants for human vaccines – current status, problems and future prospects. *Vaccine*, 1995, 13(14), 1263–1276. doi: 10.1016/0264-410X(95)00011-O
31. Poltorak A., He X., Smirnova I., et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*, 1998, 282(5396), 2085–2088. doi: 10.1126/science.282.5396.2085
32. Ledov V.A., Golovina M.E., Markina A.A., et al. Highly homogenous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection. *Vaccine*, 2019, 37(8), 1062–1072. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.12.067
33. Zhu J., Yamane H., Paul W.E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, 28, 445–489. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212
34. Hsieh C.S., Macatonia S.E., Tripp C.S., et al. Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 1993, 260(5107), 547–549. doi: 10.1126/science.8097338

The Effect of Adjuvants of Different Groups on the Immunogenicity of Vaccines against Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome

S. S. KURASHOVA^{1,*}, T. K. DZAGUROVA¹, M. S. EGOROVA¹, M. V. BALOVNEVA¹,
A. A. ISHMUKHAMETOV^{1,2}, A. A. MARKINA³, P. G. APARIN³, V. L. L'VOV³,
and E. A. TKACHENKO^{1,2}

¹*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819 Russia*

²*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia*

³*National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, 115478 Russia*

**e-mail*: svetlanak886@yandex.ru

Received November 20, 2019

Revised December 28, 2019

Accepted March 27, 2020

Abstract—Effects of different classes of adjuvants (aluminum hydroxide, spherical protein particles, thermolabile B protein, low-endotoxic pyrogen-free lipopolysaccharide) have been studied in order to enhance the immunogenicity of inactivated vaccines against hemorrhagic fever with renal syndrome. The Puumala virus-based monovaccine and multivalent vaccine based on Puumala, Hantaan and Sochi viruses were analyzed, and BALB/c mice were used as an animal model. It was shown that low-endotoxic pyrogen-free lipopolysaccharide stimulated the production of virus-neutralizing antibodies and increased the vaccine stability during storage, which allows to reduce the antigenic load of the vaccine. Aluminum hydroxide slightly increased the production of T-cells immune response mediators and did not affect the neutralizing antibodies induction and vaccine stability. Despite the adjuvant effect, it was shown that spherical protein particles and thermolabile B protein were unacceptable for vaccines administered to humans due to the high protein load and toxic effects, respectively.

Key words: hantaviruses, hemorrhagic fever with renal syndrome, inactivated vaccines, adjuvants, immune response

Acknowledgements The authors are grateful to Dr. O.V. Karpova (Department of Virology, Moscow State University) for providing the preparation of spherical particles, and to Dr. A.N. Noskov (Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow) for providing the preparation of the thermolabile enterotoxin B-subunit.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-74-85