

## Сравнительная оценка иммуногенности охарактеризованных препаратов на основе хитозана и других адъювантов в составе инактивированных вакцин против гриппа

Л.М. Хантимирова<sup>1,2</sup>, О.С. Каширина<sup>1</sup>, М.И. Черникова<sup>1</sup>, Ю.М. Васильев<sup>1</sup> (yuri.vasiliev@hotmail.com)

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва

<sup>2</sup>ФГУ «Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

### Резюме

Адъюванты на основе хитозана, сочетая эффективность, безопасность и экономическую доступность, весьма перспективны для совершенствования вакцинопрофилактики гриппа. При этом требуются более углубленные данные по связи физико-химических характеристик (ФХХ) хитозана и иммуногенности препарата на его основе, а также сравнительная оценка с другими адъювантами.

Мышей иммунизировали внутримышечно инактивированными вакцинами на основе штамма A/California/07/2009 (H1N1). К этим вакцинам добавляли охарактеризованные адъюванты на основе хитозана с различными ФХХ (молекулярная масса 700 и 10 кДа, степень деацетилирования 85%; BMX и HMX, соответственно) и его производного (сукциноил-хитозан (CX)). Также изучали экспериментальные препараты: эмульсию по типу «масло в воде» (МЭ) и многокомпонентный адъювант (МС).

Различные адъюванты неодинаково повышали иммуногенность инактивированных вакцин против гриппа по титрам сывороточных антител, задерживающих гемагглютинацию. BMX был более иммуногенным в сравнении с HMX, при этом CX при добавлении к вакцине даже снижал ее иммуногенность. BMX был сравним по иммуногенности с МС, а HMX – с МЭ.

Таким образом, ФХХ хитозана и его производных оказывают существенное влияние на иммуногенность адъювантов на их основе, а перспективные и охарактеризованные препараты на основе хитозана сравнимы или даже более иммуногенны чем адъюванты из других групп.

**Ключевые слова:** грипп, вакцина, адъювант, хитозан, доклинические исследования, иммуногенность

### Comparative Immunogenicity Evaluation of Characterized Chitosan-Based and Other Adjuvants for Inactivated Influenza Vaccines

L.M. Khantimirova<sup>1,2</sup>, O.S. Kashirina<sup>1</sup>, M.I. Chernikova<sup>1</sup>, Y.M. Vasiliev<sup>1</sup> (yuri.vasiliev@hotmail.com)

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow

<sup>2</sup>Federal State Institution «Institute of Bioengineering, Federal Research Center «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences», Moscow

### Abstract

Chitosan-based adjuvants combine effectiveness, safety and economic feasibility and thus are quite promising for enhancement of influenza control via vaccination, however, problems of characterization and reproducibility remain unresolved; data on relations between physical-chemical characteristics (PCC) of the polymer and immunogenicity of chitosan-based adjuvants, as well as comparative evaluation with other adjuvants are needed.

Groups of mice were immunized intramuscularly with inactivated influenza vaccines based on A/California/07/2009 (H1N1) strain with characterized adjuvants based on chitosan with varying PCC (molecular mass 700 and 10 kDa, deacetylation degree 85%; HMC and LMC, respectively) and its derivative (succinylated chitosan (SC)). Experimental formulations were also studied: an «oil-in-water» emulsion (ME) and a multi-component adjuvant (MS).

Different adjuvants increased immunogenicity of the inactivated influenza vaccines by hemagglutinin inhibiting sera antibodies in varying patterns. HMC was more immunogenic than LMC, whereas SC even reduced immunogenicity of the vaccine. HMC was comparable to MS by immunogenicity, and LMC – to ME.

PCC of chitosan and its derivatives play an important role in immunogenicity of the respective adjuvants, and perspective and characterized chitosan-based adjuvants are comparable or even more immunogenic than adjuvants from other groups.

**Key words:** influenza, vaccine, adjuvant, chitosan, preclinical trials, immunogenicity

### Введение

Грипп остается одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире

ежегодно гриппом заболевает до 10% взрослых и до 30% детей, эпидемии гриппа обуславливают большое количество госпитализаций, а также летальных исходов, особенно в группах риска

(маленькие дети, беременные, пожилые люди, лица с хроническими заболеваниями). Кроме того, сезонные эпидемии гриппа приводят к значительному экономическому ущербу [1].

Изменчивость вируса гриппа, стремительная передача от человека к человеку, возможность инфекции людей вирусами гриппа животных определяют высокий пандемический потенциал гриппа [1]. Так, ВОЗ отмечает актуальность вирусов гриппа птиц (серотипы H5N1, H7N9 и H9N2) и свиней (серотипы H1N1, H3N2) [2].

Своевременная вакцинопрофилактика – основной подход к борьбе с гриппом и к подготовке к возможной пандемии [1, 3]. Появление вирусов гриппа, резистентных к специфическим химиопрепаратам [4], лишь подчеркивает целесообразность использования вакцин для контроля этого инфекционного заболевания.

Современные сезонные инактивированные вакцины для профилактики гриппа имеют ряд ограничений [1, 3], прежде всего в отношении иммуногенности против антигенно отличных от вакцинных штаммов и эффективности при вакцинации некоторых популяционных групп (например, пожилых лиц). Что касается использования против гриппа в качестве альтернативы инактивированным вакцинам живых холодоадаптированных, то ряд вопросов, в частности об их эффективности и безопасности, до сих пор остается не до конца выясненным [5].

Совершенствование специфической профилактики гриппа идет по различным направлениям,

одно из наиболее перспективных – включение в состав вакцин иммуoadъювантов (адъювантов) [1, 3, 6].

Добавление к вакцинам адъювантов преследует цели, направленные на повышение иммуногенности в отношении широкого набора антигенно отличных штаммов, на упрощение схемы иммунизации (однократная), а также на снижение дозы антигена (геммагглютинина) при сохранении высокой эффективности, что особенно важно при подготовке к пандемии [6]. Однако в настоящее время адъюванты, оптимально сочетающие эффективность, безопасность, а также экономическую доступность, практически отсутствуют.

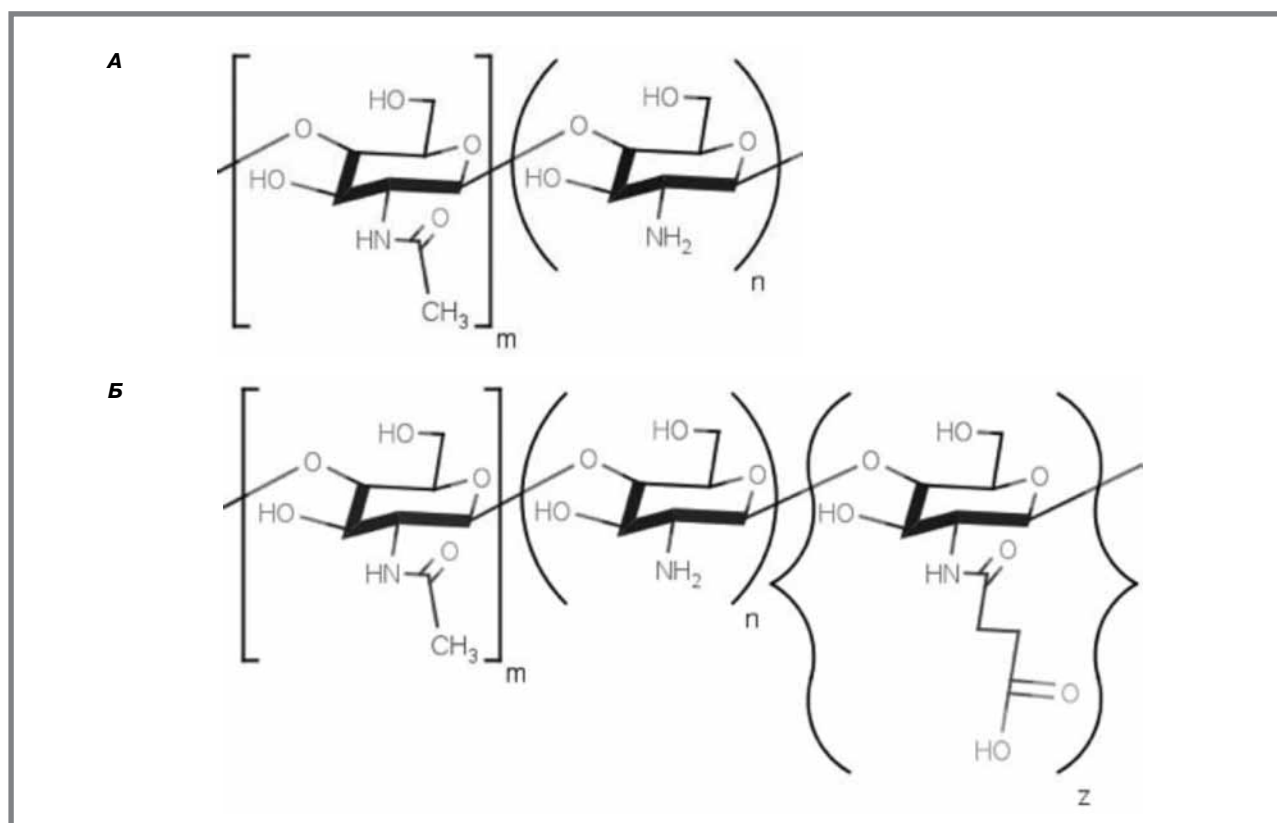
В последние годы в качестве перспективных адъювантов все больше внимания уделяют препаратам на основе биополимеров, в частности хитозану [6, 7].

Хитозан – катионный полисахарид, состоящий из остатков глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, связанных между собой  $\beta$  (1 – 4) гликозидной связью (рис. 1, А) [7]. Химическое строение хитозана как биополимера на основе производных глюкозы определяет биodeградируемость и биосовместимость, что обеспечивает высокую безопасность адъювантов на его основе. Кроме того, так как хитозан получают из хитина, который является отходом ряда отраслей промышленности, то адъюванты на его основе экономически выгодны.

В то же время, хитозан объединяет широкую группу его производных, описываемых двумя фун-

**Рисунок 1.**

**Схемы химических структур хитозана (А;  $n/(m+n) \geq 0,6$ ) и его производного – сукциноил хитозана (Б;  $(n+z)/(n+m+z) \geq 0,6$ ); мономеры распределены произвольно**



даментальными физико-химическими характеристиками (ФХХ): молекулярной массой (ММ) и степенью деацетилирования (СД) [7]. В опубликованных к настоящему времени биомедицинских исследованиях адъювантных свойств хитозана и его производных, в том числе в составе вакцин против гриппа и в рамках клинических исследований, практически отсутствуют сведения о ФХХ биополимера, неполностью представлены методики приготовления препарата и его стерилизации. Другими словами, используются неохарактеризованные субстанции, а описанные результаты – невоспроизводимы [6, 7]. По этим причинам невозможно научно обоснованно охарактеризовать взаимосвязь структуры и функций хитозана. Аналогичным образом практически не осуществима объективная сравнительная характеристика препаратов на основе хитозана и его производных, как между собой, так и с адъювантами других групп по природе и механизму действия.

С учетом вышесказанного, уникальная комбинация свойств хитозана как адъюванта – потенциально высокая эффективность, безопасность и экономическая целесообразность внедрения – остается во многом недоказанной и, как следствие, требуются объективные данные, полученные в рамках исследований высокого научно-методического уровня.

**Цель настоящей работы** – оценка иммуногенности охарактеризованных адъювантов на основе хитозана с принципиально различными ФХХ при добавлении к инактивированной вакцине против гриппа на модели мышей (уровень доклинических исследований), а также сравнение с другими адъювантами.

## Материалы и методы

Все методики основаны на материалах ВОЗ [8] и действующей нормативно-технической документации (МУ 3.3.2.1758-03). Все работы выполнялись в строгом соответствии с санитарными нормами и правилами (СП 1.3.2322-08).

## Животные

Использовали группы по 10 нелинейных мышей (белые, беспородные, самки, весом 14 – 16 г (на момент первой иммунизации); ФГБУН «НЦБМТ», филиал «Андреевка», Московская область).

Также использовали 9-дневные куриные эмбрионы (ФГУП «ППЗ «Птичное», Московская область). Получение суспензии эритроцитов кур проводили после выдерживания 9-дневных куриных эмбрионов при 34 °С в течение 3 – 4 дней (до возраста 12 – 13 дней).

План исследования, в том числе работы с животными (в рамках тематики НИР), был рассмотрен и утвержден Ученым советом НИИ вакцин и сывороток им И.И. Мечникова (НИИ ВС). Работа с животными (мышами) в виварии проводилась в соответствии с локальными правилами и актами.

## Вирус и вакцина

Использовали инактивированную цельновирионную эмбриональную вакцину, полученную из очищенного и концентрированного препарата на основе штамма вируса гриппа свиного происхождения (тройной реассортант) A/California/07/2009 X-179A (H1N1). Маточный материал (неочищенный) получен из коллекции НИИ ВС.

Для получения экспериментальной вакцины и определения иммуногенности вирусы нарабатывали путем пассирования на куриных эмбрионах (48 часов при 36 °С). После пассажа и охлаждения вирусы очищали и концентрировали поэтапным центрифугированием: 10 минут при 2000 g, 30 минут при 5000 g и 30 минут при 35 000 g (последний этап повторяли 3 раза). Ресуспендирование проводили в стерильном фосфатно-солевом растворе (ФСР).

После накопления вирусные препараты контролировали на стерильность (тиогликолевая среда, ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболенск, Московская область), а также биологическую активность. Дальнейшую работу проводили только с теми партиями вирусных препаратов, которые были стерильны и удовлетворяли требованиям по биологической активности. Так, препараты контролировали по гемагглютинирующей (реакция гемагглютинации с эритроцитами кур) и инфекционной (титрование в куриных эмбрионах, инкубация 48 часов при 36 °С) активности.

Из партии очищенного и концентрированного стерильного вирусного препарата готовили инактивированную цельновирионную вакцину. Инактивацию проводили 0,05% формальдегидом (2 часа при 36 °С). Оптимальный режим инактивации выбирали на основе данных о динамике инактивации для полученного очищенного и концентрированного вирусного препарата (данные не представлены). Удаление инактивирующего агента проводили центрифугированием (30 минут при 35 000 g), при этом формальдегид удаляли вместе с супернатантом, а осадок антигена ресуспендировали в ФСР. Инактивированную цельновирионную вакцину проверяли на полноту инактивации (в куриных эмбрионах), а также стерильность как описано выше.

## Адъюванты

Подробные сведения об адъювантах на основе хитозана и его производного – сукциноил-хитозана (СХ), в том числе сокращенные названия и ФХХ, представлены в таблице 1. Схемы химических структур на рис. 1 (А – хитозан, Б – СХ).

Для получения высокомолекулярного хитозана (ВМХ) исходную субстанцию хитозана (ЗАО «Биопрогресс», г. Щелково) очищали фильтрованием, переосаждением с центрифугированием и диализом. Низкомолекулярный хитозан (НМХ) получали из ВМХ с использованием ферментного препарата, продуцируемого мицелиальным грибом *Myceliophthora sp.* [9], и затем очищали аналогичным образом. Для получения СХ исход-

**Таблица 1.**  
**Адьюванты на основе хитозана и его производного**

Образец	Сокращенное название	ММ, кДа	СД, %
Высокомолекулярный хитозан	ВМХ	700	85
Низкомолекулярный хитозан	НМХ	10	85
Сукциноил-хитозан	СХ	Степень замещения 50%	

ную субстанцию (ЗАО «Биопрогресс», Щелково) очищали аналогично ВМХ. После очистки ВМХ, НМХ и его производное подвергали лиофильной сушке.

Для ВМХ и НМХ определяли фундаментальные ФХХ: ММ и СД. Для СХ выявляли степень замещения (СЗ). Средневязкостную ММ хитозана выясняли методом капиллярной вискозиметрии с использованием уравнения Марка-Хаувинка (Марка-Куна-Хаувинка-Сакурады; коэффициенты для образцов хитозана с СД 85%:  $\kappa = 1,38 \times 10^{-4}$ ;  $\alpha = 0,85$ ) [10]. СЗ определяли методом протонного магнитного резонанса (ПМР) с использованием спектрометра Bruker AMX 400 (США) [11].

Готовили 1,0% растворы адьювантов на основе хитозана и его производного в глутаминовой кислоте при pH 5,01 (ВМХ и НМХ) или щелочи (гидроксид натрия) при pH 8,01 (СХ), используя реактивы Sigma-Aldrich (США). Стерилизацию адьювантов проводили автоклавированием (121 °C, 15 мин).

Для сравнения брали экспериментальные адьюванты (ГРИА НИИ ВС): эмульсию по типу «масло в воде» (МЭ) и многокомпонентный адьювант (МС).

В качестве контроля использовали: вакцину без адьюванта, вместо которого добавляли буфер на основе ФСР с pH 5,01 и 8,01; группу неиммунизированных мышей той же партии, что и иммунизируемые.

Адьюванты и буфер на основе ФСР добавляли к вакцине в соотношении по объему 1:1 (конечная концентрация адьювантов на основе хитозана и его производного – 0,5%).

#### Иммунизация и получение биологического материала

Группы мышей иммунизировали внутримышечно в заднюю конечность (в объеме 0,2 мл: по 0,1 мл вакцины и адьюванта или контроля) двукратно с интервалом 14 дней. Отбор крови проводили под полным эфирным наркозом через 14 дней после первой и второй иммунизации.

#### Реактогенность

После каждой иммунизации животных наблюдали ежедневно в течение 7 дней, особое внимание уделяя месту инъекции (дополнительно – в момент второй иммунизации и при отборе крови).

#### Иммуногенность

Обработку и анализ всех сывороток проводили одновременно.

Сыворотки после получения и очистки центрифугированием (1000 g, 10 мин) разводили в ФСР 1:10 и прогревали на водяной бане при 56 °C в течение 30 минут. Азид натрия к сывороткам не добавляли.

Иммуногенность определяли по реакции задержки гемагглютинации (РЗГА) с использованием суспензии эритроцитов кур. Реакцию ставили против очищенного и концентрированного вирусного препарата той же партии, что и для изготовления вакцины. РЗГА ставили в 4 повторях при рабочей дозе вируса 8 ГАЕ/0,05 мл. Минимальный определяемый титр (предел чувствительности) составил 1:5.

Все биологические реакции титрования ставили не менее чем в 4 повторях, результаты представлены как среднее титров по всем повторам.

#### Результаты и обсуждение

Первый этап настоящего исследования – получение образцов хитозана (ВМХ и НМХ; см. рис. 1, А) и его производного (СХ; см. рис. 1, Б) и определение их фундаментальных ФХХ (ММ и СД; см. табл. 1). Как отмечалось выше, в настоящее время отсутствуют данные по адьювантным свойствам препаратов на основе хитозана охарактеризованных даже по базовым ФХХ [7]. В результате впервые был получен небольшой набор адьювантов на основе хитозана, при этом для образцов хитозана теми же методами определены ММ и СД (см. табл. 1), а методика приготовления адьювантов и подход его стерилизации – аналогичны и полностью описаны.

Для объективной характеристики иммуногенности новых и перспективных адьювантов, в частности на основе хитозана, необходимо сравнение с другими препаратами, причем различной природы и механизма действия [6, 7]. С этой целью в исследования были включены два экспериментальных адьюванта, разрабатываемые на базе ГРИА НИИ ВС и находящиеся на различных этапах НИОКР и доклинических исследований. Оба препарата в ряде независимых исследований на модели различных антигенов и животных существенно превосходили по иммуногенности и защитной эффективности все другие адьюванты, отличные по природе и механизму действия: минеральные соли и основания, эмульсии по типу «масло в воде» и «вода в масле», иммуномодуляторы (результаты готовятся к публикации). МЭ и МС – комплексные адьюванты нового поколения, представляющие собой модифицированную эмульсию по типу «масло в воде»

**Таблица 2.**  
**Иммуногенность адъювантов**

Адъювант	Титры антител по РЗГА, 1/х	
	иммунизация I	иммунизация II
ВМХ, pH 5,01	160	2560
НМХ, pH 5,01	40	640
СХ, pH 8,01	< 5*	35
МС	160	2240
МЭ	80	640
Контроль, pH 5,01	40	160
Контроль, pH 8,01	10	80

Примечание: \* в пределах чувствительности метода не определяется

и многокомпонентный препарат, соответственно. Сравнение иммуногенности этих адъювантов с препаратами на основе хитозана проведено впервые.

Изготовленные для исследования партии вирусного препарата и экспериментальная инактивированная вакцина удовлетворяли требованиям, изложенным в разделе «Материалы и методы» (результаты не представлены).

Основные результаты исследования (табл. 2) – иммуногенность (среднее титров сывороточных антител по РЗГА против вакцинного вируса) различных адъювантов в составе инактивированной цельновирионной моновалентной вакцины на основе вируса гриппа свиного происхождения после однократной и двукратной внутримышечной иммунизации мышей (уровень доклинических исследований). Следует подчеркнуть, что прямое сравнение адъювантов – работа с подопытными животными и оценка иммуногенности – проводилось в рамках одной серии экспериментов (одновременно).

Совокупность полученных данных показала, что различные адъюванты неодинаково повышают иммуногенность вакцины (см. табл. 2). Так, ВМХ был существенно более иммуногенен в сравнении с НМХ. Прирост среднего титров антител в сравнении с вакциной без адъюванта (при аналогичном pH) после второй иммунизации с ВМХ и НМХ составил 16 и 4 раза, соответственно. В одном из повторов титр после второй иммунизации для ВМХ достигал 1:5120. Более того, иммуногенность ВМХ после первой иммунизации была сравнима с таковой после второй иммунизации вакциной без адъюванта, при этом НМХ не индуцировал большие титры антител после первой иммунизации в сравнении с вакциной без адъюванта.

Полученные данные впервые демонстрируют иммуногенность охарактеризованных адъювантов на основе хитозана. Поскольку НМХ был получен путем ферментного гидролиза на основе ВМХ и единственное значимое отличие между препаратами – ММ, впервые получены не только доказательства адъювантного действия препаратов на основе

хитозана, но также зависимости иммуногенности от ФХХ, причем снижение ММ приводит к снижению титров антител.

Что касается литературных данных, то, как отмечалось выше, характеристики хитозана, описание методик приготовления и стерилизации ограничены и, как следствие, воспроизводимость представленных результатов затруднительна. Более того, сравнительных исследований различных хитозанов даже без учета научно-методического уровня практически нет. Так, в одной, если не единственной, работе такого рода, сравнивали три препарата на основе хитозана [12], однако их ФХХ различались в небольшом диапазоне, причем один из них применялся в форме суспензии, а не раствора. В качестве адъюванта сравнения авторы взяли препарат на основе алюминия («alum»), однако без уточнения варианта (соль или основание и т.п.). Кроме того, использовалась не вакцина, а модельный антиген овальбумин, что не позволяет сопоставить данные этой работы с полученными нами. Исследование имеет ряд других методических ограничений, а некоторые моменты вызывают определенные вопросы, обсуждение которых выходит за рамки проблематики настоящей работы.

Тем не менее, заслуживает внимания основной вывод авторов о том, что степень иммунного ответа неодинакова для хитозанов различного качества, что в свою очередь определяется различными характеристиками, в частности химическими и физическими свойствами, а также способом приготовления.

Для изучения роли заряда и поликатионной природы хитозана в реализации адъювантного действия в исследование был включен препарат на основе производного хитозана – СХ (см. рис. 1, Б). Высокая СЗ определяет преобладание отрицательного заряда биополимера и растворимость в слабощелочных pH (а не слабокислых как для немодифицированных хитозанов – ВМХ и НМХ). В качестве контроля этого препарата в исследование включали вакцину без адъюванта, с добавлением



буфера с pH 8,01. Результаты показали, что CX не просто не повышает, но даже снижает иммуногенность в сравнении с вакциной без адъюванта, причем как после первой, так и второй иммунизации. При этом добавление к вакцине буфера с pH 8,01 в сравнении с pH 5,01 также приводило к некоторому снижению иммуногенности.

В соответствии с позицией ВОЗ основной параметр оценки иммуногенности инактивированных вакцин против гриппа – титры сывороточных антител в РЗГА [1], причем титры 1:40 соответствуют 50% защитной эффективности (по данным клинических исследований). С учетом этого суррогатного параметра добавление CX к вакцине снижает иммуногенность ниже порогового значения даже после второй иммунизации. Необходимо также отметить, что полученная нами вакцина без адъюванта (добавление буфера с pH 5,01) индуцировала титры антител на уровне порогового значения уже после первой иммунизации, то есть соответствовала позиции ВОЗ по этому показателю.

Сравнение иммуногенности адъювантов на основе хитозана (BMX и HMX) и его производного (CX) позволяет говорить о принципиальной роли положительного заряда (поликатионность) в механизмах адъювантного действия хитозана. Дальнейшее изучение этого фактора затруднено тем, что хитозан – один из немногих природных поликатионов, если не единственный из доступных. Так, любой поликатион может обладать адъювантностью, а не только хитозан, что предстоит выяснить в дальнейшем.

В целом, в проведенных сериях экспериментов наибольшая иммуногенность четко наблюдалась именно для BMX с высокой СД. Тем не менее, в настоящей работе сравнивали небольшое количество хитозанов, в связи с чем необходимы дальнейшие масштабные исследования по уточнению связи ФХХ и адъювантности препаратов на основе хитозана. Несомненный интерес представляет изучение более широкого набора хитозанов с различными ФХХ; в первую очередь – с высокой ММ при различной СД. Также необходимо использование различных подходов определения ФХХ, в частности хроматографических методов и ПМР. Кроме того, целесообразно продолжить изучение механизмов адъювантного действия препаратов на основе хитозана, в частности таких факторов как pH, растворитель (противоион), а также различных других характеристик субстанции хитозана, в том числе примесей [7]. Не исключено, что любые манипуляции на этапе приготовления адъюванта (в особенности растворение и стерилизация) также оказывают влияние на иммунобиологическую активность конечного препарата. Необходимо отметить, что переходить на изучение защитного эффекта и, тем более, иммунологических механизмов действия целесообразно после накопления достаточного количества данных по связи ФХХ с адъювантными свойствами по иммуногенности, которые позволят выявить конкретные перспективные препараты или ряд препаратов с ФХХ в определенном интервале.

Что касается изучения адъювантных свойств производных хитозана, то сначала необходимо всесторонне изучить простые препараты на основе хитозана (растворы). Наши исследования показали, что не всякое производное хитозана будет иммуногенным (даже если базовый хитозан является таковым, особенно в паре BMX/CX). Более того, производные и модификации хитозана должны существенно превосходить исходные препараты, причем также необходимы доказательства безопасности: производное в отличие от базового хитозана может быть токсичным.

BMX и HMX, в целом, оказались сравнимы с экспериментальными адъювантами МЭ и МС, хотя BMX после второй иммунизации индуцировал даже несколько больше титры антител; выше отмечалось, что МЭ и МС являются весьма мощными адъювантами. Впервые проведенное прямое сравнение препаратов на основе хитозана с адъювантами, отличающимися по природе и механизму действия, доказало перспективы хитозана как основы эффективных иммуноадъювантов для вакцин против гриппа следующего поколения.

Необходимо также отметить, что местных (в месте введения) и общих (вплоть до падежа) побочных реакций после введения любых изученных вакцин и адъювантов не наблюдалось, что является вместе с полученными нами данными по иммуногенности подтверждением эффективности и безопасности перспективных адъювантов на основе хитозана.

Практически единственное опубликованное сравнительное исследование хитозана с другим адъювантом (в данном случае – гидроксид алюминия) в составе вакцины против гриппа, вводимой парентерально [13], к сожалению, не содержит никаких данных о ФХХ хитозана (указан лишь источник – «Sigma»). Приведены некоторые сведения о приготовлении адъюванта (концентрация 0,2%, растворение в 25 мМ ацетате натрия при pH 5,0), однако указаний о стерилизации нет. Все это не позволяет сопоставить данные этой работы с нашими результатами и подчеркивает проблемы характеристики адъювантов на основе хитозана (даже по фундаментальным ФХХ), приготовления препаратов и стерилизации и, как следствие, воспроизводимости результатов опубликованных работ.

Таким образом, совокупность полученных нами данных показывает, что адъюванты на основе хитозана весьма перспективны для вакцин против гриппа, а также не уступают различным другим препаратам, причем адъювантное действие хитозана зависит от его ФХХ.

Перспективы хитозана как адъюванта заложены в возможности, с одной стороны, разработки универсального препарата для любых вакцин, а, с другой стороны, оптимального варианта для конкретной вакцины вне зависимости от типа и способа введения. Все это позволяет рассматривать хитозан как инновационную платформу иммуноадъювантов с управляемыми свойствами, облада-

ющим также потенциалом опережающего развития. Однако, прежде всего, необходимо, как отмечалось выше, детальное уточнение механизмов действия как со стороны субстанции хитозана (различные ФХХ, чистота), так и собственно адъюванта (методика приготовления и стерилизации), а также иммунологических компонентов адъювантного действия, в том числе в реализации защитного эффекта.

## Выводы

1. ФХХ хитозана (ММ и СД) определяют иммуногенность охарактеризованного адъюванта на его основе в составе инактивированных вакцин против гриппа, вводимых мышам внутримышечно.
2. Наибольшая иммуногенность наблюдалась для охарактеризованного адъюванта на основе хитозана с высокой ММ и СД. Прирост среднего титров сывороточных антител в РЗГА после второй иммунизации в сравнении с вакциной без адъюванта составил 16 раз.
3. Перспективные и охарактеризованные адъюванты на основе хитозана не только не уступа-

ют, но в некоторых случаях даже демонстрируют более высокую иммуногенность по сравнению с весьма мощными препаратами, отличающимися по природе и механизму действия.

4. Необходимо дальнейшее изучение адъювантов на основе хитозана, в первую очередь уточнение связи структуры полимера и иммунобиологической активности, в частности в рамках сравнительного анализа набора полностью охарактеризованных препаратов на основе субстанций с широким диапазоном ФХХ.
5. Представляет несомненный интерес сравнительная характеристика перспективных и охарактеризованных адъювантов на основе хитозана с другими препаратами всех основных групп по природе и механизму действия на модели различных антигенов.

Авторы выражают глубокую признательность С.В. Денисенко (УПЖ МПБП ФГУП «НПО «Микроген») и Е.Н. Булатовой (ГРИА ФГБНУ «НИИ ВС им. И.И. Мечникова») за помощь в работе с животными.

## Литература

1. WHO. Vaccines against influenza WHO position paper - November 2012. WER. 2012; 47: 461 – 476.
2. WHO. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness. WER. 2015; 42: 561 – 571.
3. Васильев Ю.М. Направления совершенствования вакцин против гриппа. Врач. 2014; 8: 12 – 14.
4. Васильев Ю.М. Ингибиторы нейраминидазы для специфической профилактики и терапии гриппозной инфекции. Врач. 2014; 2: 17 – 19.
5. Каширина О.С., Васильев Ю.М. Живые аттенуированные и инактивированные гриппозные вакцины: данные прямых сравнительных исследований. ЖМЭИ. 2014; 1: 103 – 119.
6. Черникова М.И., Васильев Ю.М. Вакцины против гриппа с иммуоадъювантами: данные прямых сравнительных исследований. ЖМЭИ. 2015; 5: 88 – 102.
7. Vasiliev Y. Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation. Expert Review of Vaccines. 2015; 1: 37 – 53.
8. WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011.
9. Хасанова Л.М., Ильина А.В., Варламов В.П., Синицына О.А., Синицын А.П. Деполимеризация хитозана с использованием ферментного комплекса, продуцируемого *Myceliophthora* sp. Прикладная биохимия и микробиология. 2014; 4: 422 – 428.
10. Wang W., Bo S., Li S., Qin W. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. International Journal of Biological Macromolecules. 1991; 5: 281 – 285.
11. Hirai A., Odani H., Nakajima A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. Polymer Bulletin. 1991; 1: 87 – 94.
12. Scherließ R., Buske S., Young K., Weber B., Rades T., Hook S. In vivo evaluation of chitosan as an adjuvant in subcutaneous vaccine formulations. Vaccine. 2013; 42: 4812 – 4819.
13. Chang H., Li X., Teng Y., Liang Y., Peng B., Fang F. et al. Comparison of adjuvant efficacy of chitosan and aluminum hydroxide for intraperitoneally administered inactivated influenza H5N1 vaccine. DNA and Cell Biology. 2010; 9: 563 – 568.

## References

1. WHO. Vaccines against influenza WHO position paper. November 2012. WER. 2012; 47: 461 – 476.
2. WHO. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness. WER. 2015; 42: 561 – 571.
3. Vasiliev Y.M. Directions of enhancement for influenza vaccines. Physician. 2014; 8: 12 – 14 (in Russian).
4. Vasiliev Y.M. Neuraminidase inhibitors for specific prophylaxis and therapy of influenza. Physician. 2014; 2: 17 – 19 (in Russian).
5. Kashirina O.S., Vasiliev Y.M. Live attenuated and inactivated influenza vaccines: data from direct comparative studies. Journal of Microbiology. Moscow; 2014; 1: 103 – 119 (in Russian).
6. Chernikova M.I., Vasiliev Y.M. Adjuvanted influenza vaccines: data from direct comparative studies. Journal of Microbiology. Moscow; 2015; 5: 88 – 102 (in Russian).
7. Vasiliev Y. Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation. Expert Review of Vaccines. 2015; 1: 37 – 53.
8. WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011.
9. Khasanova L.M., Il'ina A.V., Varlamov V.P., Sinitsyna O.A., Sinitsyn A.P. Depolymerization of chitosan using an enzyme complex produced by *Myceliophthora* sp. Applied biochemistry and microbiology. 2014; 4: 422 – 428 (in Russian).
10. Wang W., Bo S., Li S., Qin W. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. International Journal of Biological Macromolecules. 1991; 5: 281 – 285.
11. Hirai A., Odani H., Nakajima A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. Polymer Bulletin. 1991; 1: 87 – 94.
12. Scherließ R., Buske S., Young K., Weber B., Rades T., Hook S. In vivo evaluation of chitosan as an adjuvant in subcutaneous vaccine formulations. Vaccine. 2013; 42: 4812 – 4819.
13. Chang H., Li X., Teng Y., Liang Y., Peng B., Fang F. et al. Comparison of adjuvant efficacy of chitosan and aluminum hydroxide for intraperitoneally administered inactivated influenza H5N1 vaccine. DNA and Cell Biology. 2010; 9: 563 – 568.