

УДК: 616.921.5:615.371:615.076(047.31)

## МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ И ОЦЕНКИ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

Волянский А.Ю., Давыдова Т.В., Кучма И.Ю.

ГУ «Институт микробиологии и иммунологии  
им. И.И. Мечникова НАМН Украины»

Несмотря на серьёзные достижения медицинской науки в последние десятилетия, грипп является одной из наиболее весомых проблем для человечества среди составных которой, есть не только медицинские аспекты, но политические, экономические и даже геополитические. Грипп остаётся опасным для здоровья и даже жизни людей. Это доказывают события последних лет – пандемия гриппа 2009-2011 годов. Что же позволяет этому заболеванию оставаться лидером среди инфекционных болезней, охватывая и причиняя вред здоровью миллионов людей? Факторами, делающими вирус гриппа столь опасным, являются: уникальная изменчивость; широкий спектр животных и птиц, участников эпидемического процесса; высокая контагиозность; возможность длительной персистенции и рециркуляции; большое количество опасных осложнений [1].

Обще известно, что самым эффективным методом управления за распространением и проявлением возможных осложнений инфекционных заболеваний является вакцино-профилактика [1,2]. Поэтому для заболевания, способного вызывать эпидемии практически каждый год, нанося большой вред здоровью людей и значительные материальные убытки, весьма важно найти оптимальный вакцинный препарат, способный надежно защитить население с минимальными побочными эффектами [3]. В силу выраженной и неуклонной изменчивости вирусов гриппа А и В состав вакцин ежегодно обновляется в соответствии рекомендациям Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ). Согласно этим рекомендациям все противогриппозные вакцины сезона 2011 / 2012 содержат следующие штаммы вирусов гриппа типов А и В: А / Калифорния / 07 / 2009 (H1N1) - подобный вирус; А / Перт / 16 / 2009 (H3N2) - подобный вирус; В / Брисбен / 60 / 2008 - подобный вирус. Расщепленные вакцины и субъединичные вакцины имеют, согласно требованиям Европейской Фармакопеи, различное общее содержание белка: не более 100 мкг на один использованный штамм (или одну дозу моно валентной вакцины) и 80 мкг соответственно [4].

Целью исследования явился анализ взаимосвязи между иммуногенностью и особенностями нуклеопротеидного состава различных коммерческих противогриппозных вакцин. Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы на базе ГУ «ИМН им.

И.И. Мечникова МАНУ» «Взаимосвязь иммуногенности актуальных противогриппозных вакцин с особенностями их нуклеопротеидного состава», № госрегистрации 0110U001418.

### Материалы и методы

Объект исследования: периферическая кровь лабораторных животных, актуальные противогриппозные вакцины.

Эксперимент проводился на 192 беспородных белых мышках весом 20-22г. Для исследования избраны моновалентные противопандемические вакцины с актуальными штаммами вирусов гриппа: «Паненза» (Санофи Пастер, Франция), «МоноГриппол» (ООО «Петровакс»), «МоноГриппол Нео Плюс» (ООО «Петровакс»), субъединичный субстрат вакцины «МоноГриппол» (любезно предоставленный для эксперимента НИИ вакцин и сывороток, Санкт-Петербург, Россия). Препарат «Паненза» является инактивированной моно валентной расщепленной безадыювантной вакциной, содержащей 15 мкг ГА изолированного штамма вируса A/California/07/2007 (H1N1) на дозу. В индивидуальных формах выпуска не содержит консервантов, противопоказана людям с повышенной чувствительностью к яичному белку, который входит в состав вакцины. Моногриппол это вакцина инактивированная полимер-субъединичная адьювантная на основе пандемичных штаммов, при изготовлении которой используют безопасную технологию на культуре клеток кишечной палочки, что делает ее безопасной для людей с аллергией на белки куриного яйца [5]. Для получения белковых вирусных антигенов применяются протеины теплового шока бактерий, тем самым улучшая их презентацию. Субстрат вакцины Моногриппол не содержит адьюванта (полиоксидония).

Состав белков исследуемых вакцин изучали с помощью биоанализатора «Agilent-2100». SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) представляет собой метод разделения и идентификации белковых смесей за счет электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии детергента - додецилсульфата натрия в модификации Леммли. Иммуногенность вакцин оценивали с использованием реакции торможения гемагглютинации (РТГА) со специфическими антигенами, которая позволяет выявить противовирусные антитела в сыворотке крови. Для разрушения неспецифических ингибиторов гемагглютинации (ГА) в исследуемых сыворотках использовалась нейроминидаза холерных вибрионов [2].

Животных иммунизировали в 1-е сутки и затем на 14-е сутки в/б в дозе 0,3 мл, формируя группы, используя вакцины Паненза, Моногриппол, субстрат вакцины Моногриппол. Контрольной группе вводилась в/б стерильная вода для инъекций в дозе 0,3 мл в 1-е и 14-е сутки. В каждую из групп входило по 24 животных, которых выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным

наркозом с получением сыворотки крови: 50% на 14 сутки и остальных на 30 сутки. Из полученных сывороток крови, после удаления неспецифических ингибиторов ГА, готовили двухкратное разведение в лунках плексигласового планшета, начиная от 1:10 до 1:640 в объёме 0,2 мл. К каждому разведению сыворотки добавляли 0,2 мл робочей дозы антигена (4 АО). Затем помещали в шейкер и после перемешивания оставляли на 30 мин при температуре  $20 \pm 2$  С, добавляли в каждую лунку 0,4 мл 1% суспензии куриных эритроцитов, снова перемешивали в шейкере с последующей выдержкой при той же температуре в течении 45 мин, после чего проводился учёт результатов реакции. При присутствии специфических антител в сыворотке наблюдалось торможение агглютинации эритроцитов. За титр сыворотки брали то граничное разведение, которое вызывало полное торможение ГА. Торможение ГА свидетельствует о соответствии типа антигена и взятой сыворотки, а отсутствие торможения про несоответствие. Статистически обработка проведена при помощи пакета прикладных программ Microsoft Excel – Statgraphics. Для определения погрешности показателей использовали t-критерий Стьюдента. Расхождение считали достоверным при уровне значащей р меньше 0,05.

#### Результаты и обсуждение

С помощью биоанализатора «Agilent-2100» определено количество протеинов, их суммарную массу и процентное соотношение в каждой из исследованных вакцин. В результате проведенных исследований белкового состава вакцин (субстрат Моногриппола не отличался от соответствующей вакцины белковым составом, а лишь отсутствием адьюванта) было установлено, что общее количество белка в субъединичной вакцине Моногриппол ниже, чем у вакцины Пененза – 67,14 мкг/мл и 119,86 мкг/мл соответственно. Все взятые в опыт препараты соответствовали нормативам Европейской Фармакопеи по общему количеству

белка. Субъединичная вакцина Моногриппол содержит 2 белковых компонента, расщепленная вакцина «Паненза» - 5 протеиновых составляющих соответственно. Молекулярная масса белковых фрагментов колебалась от 15 KDa до 50 KDa, подавляющее большинство протеинов представлены фрагментами с молекулярной массой  $26 \pm 1,0$  KDa,  $32 \pm 1,0$  KDa,  $42 \pm 1,0$  KDa,  $48 \pm 2,0$  KDa. Учитывая, что молекула гемагглютинина имеет массу 225 KDa и представляет собой тример с массой каждой единицы 75 KDa, а тетраметр нейраминидазы весит около 200-250 KDa, то вполне логично предположить, что на этапах производства исследованных вакцин имеет место нарезка поверхностных белков на более мелкие фрагменты. В вакцине «Паненза» превалировал белок с молекулярной массой 16,4 кДа, количество которого в препарате составляло 80,19 мкг/мл (66,9% белкового состава), а белки массой 21,4 кДа – 38,47 мкг/мл (32,1%). В вакцине Моногриппол основную часть составили протеины с массой 32,0 кДа о объёме 46,12 мкг/мл (68,7% от общего количества), а так же белок 48,2 кДа в количестве 21,01 мкг/мл (31,3%). Иммуный ответ по большей мере обусловлен антигенной организацией молекулы гемагглютинина, отличие между типами вакцин по форме антигена состоит в том, что в расщепленных вакцинах гемагглютинин прикреплен к фрагментам вирусной мембраны, а в субъединичных вакцинах он присутствует в отдельных молекулах. Именно это может менять эффективность иммунного ответа. Если молекула гемагглютинина заключена в липидную капсулу, как в расщепленных вакцинах, реакция В-лимфоцитов по выработке защитных антител, а так же память В-лимфоцитов будет большей, чем в случае очищенных гликопротеиновых препаратов (субъединичные вакцины).

Результаты исследования иммуногенности изучаемых вакцинных препаратов представлены в таблице.

**Таблица Противогриппозные антитела в сыворотке крови мышей**

Титры противогриппозных антител у иммунизированных животных, (%) M+m								
Вакцинные препараты и дозы		1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
			$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$10 \pm 0,1$	$70 \pm 0,18$
«Паненза» 9 мкг	1 *	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$30 \pm 0,12$	$60 \pm 0,13$	$10 \pm 0,1$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$
	2 *	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$10 \pm 0,1$	$70 \pm 0,18$	$20 \pm 0,14$
«Моно Гриппол» 3 мкг	1 *	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$10 \pm 0,1$	$90 \pm 0,16$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$
	2 *	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$20 \pm 0,11$	$10 \pm 0,1$	$70 \pm 0,18$
убстрат «Моно Гриппол» 3 мкг	1 *	$0 \pm 0,01$	$30 \pm 0,12$	$20 \pm 0,11$	$50 \pm 0,12$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$
	2 *	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$20 \pm 0,11$	$80 \pm 0,158$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$
Контроль 0,3мл физ. раствора	1 *	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$
	2 *	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$	$0 \pm 0,01$

Примечание: \* введение данного препарата

В 4 раза отмечен прирост гомологичных антител в крови у 60% подопытных животных после первой иммунизации вакциной Паненза и в 16 раз после второй – у 70% (табл.1). После первой вакцинации Моногрипполом гомологичные антитела у 90% выросли в 8 раз, а вторая вакцинация подняла этот показатель в 32 раза у 70% вакцинированных животных. Субстрат Моногриппол так же дал достаточную выработку АТ (первая – в 4 раза у 50% животных, вторая – в 8 раз у 80% животных).

Таким образом установлено, что Моногриппол -- рекомбинантная субъединичная вакцина, которая состоит из 2 белковых составляющих практически в равных частях и имеет меньшее общее количество белка в отличие от вакцины Паненза, которая помимо этого содержит 5 белковых составляющих. Моногриппол обладает в два раза большей иммуногенностью в сравнении с Панензой. При сравнении этих показателей у вакцины Моногриппол и ее субстрата, то видна отчетливая связь между повышением иммунного ответа и присутствием адъюванта полиоксидония (сополимер N –оксида 1,4 этиленпиперазида и (N-карбоксиил)-1,4 этиленпиперазинию бромид) [6,7]. Указанное подтверждает, что адъювант в конъюгированных препаратах существенно влияет на иммунный ответ, вне зависимости от низкого содержания белка в составе вакцины. Данные про иммуногенность обоих исследованных вакцин соответствуют требованиям к вакцинам указанного типа, то есть вызывают прирост гомологичных антител в крови в 4 раза и более чем у 60% животных после двукратного введения [4,5,8].

Однако, окончательно говорить об уровне защиты от клинического заболевания, частоты и тяжести побочных эффектов, а также эпидемическая значимость препаратов может быть оценена только в клинических условиях.

### Выводы

Изучив связь между иммуногенностью и количеством специфического белка в вакцинных препаратах, мы показали, что наиболее мощный прирост продукции антител обуславливается присутствием современных адъювантов, в нашем исследовании это полиоксидоний («Моногриппол»). Исходя из полученных результатов можно будет рекомендовать использовать коэффициент связи «иммуногенность / количество белка» для более эффективного скрининга кандидатов в официальные препараты, с целью снижения их реактогенности, а также снижения затрат на производство противогриппозных вакцин.

### Литература

1. Лавров, В.Ф. Основы иммунологии, эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней [Текст] / В.Ф. Лавров, Е.В. Русакова, А.А. Шапошников и др. – М.: ЗАО «МП Гигиена», 2007. – 311 с.

2. Караулов А.В. Инфекции и иммунодефициты – приоритеты сегодня [Текст] // Практикующий врач. – 1997. - №9. – С.3-4.

3. Бектимиров, Т.А. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа: Методические указания. [Текст] / Т.А. Бектимиров, Н.И. Лонская, Н.А. Агафонова и др. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 32 с.

4. Chaloupka, I. Comparative analysis of six European influenza vaccines [Text] / I. Chaloupka, A.Schuler, M. Marschall, H. Meier-Ewert et.al // Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. – 1996. – Vol.15. – P.121-127.

5. Xie, H. Evaluating the vaccine potential of en influenza A viral hemagglutinin and matrix double insertion DNA plasmid [Text] / H. Xie, T. Liu, H. Chen et.al // Vaccine. – 2007. – Vol. 25, № 44. – P. 7646-7655.

6. Grebe, K. M. Heterosubtypic immunity to influenza A virus: where do we stand? [Text] / K. M. Grebe, J. W. Yewdell, J. R. Bennik et.al // Microbes and Infecction. — 2008. – Vol. 10, № 9. – P. 1024-1029.

7. Ochiai, H. Inactivated influenza vaccine effectiveness against influenza-like illness among young children in Japan – With special reference to minimizing outcome misclassification [Text] / H. Ochiai, M. Fujieda, S. Ohfuji // Vaccine. – 2009. – Vol. 27, № 50. – P. 7031-7035.

8. Ladd, D. J. Innunogeniciti of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza [Text] / D. J. Ladd, J.Yan, N. Corbitt // Vaccine. – 2007. – Vol.25, № 16. – P. 2984 -2989.

УДК: 616.921.5:615.371:615.076(047.31)

### МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ И ОЦЕНКИ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

Волянский А.Ю., Давыдова Т.В., Кучма И.Ю.

Самым эффективным методом управления распространением инфекционных заболеваний является вакцинопрофилактика. Поэтому, для заболевания, которое способно вызвать эпидемии и пандемии практически каждый год, нанося большой вред здоровью людей и значительные материальные убытки, важно найти оптимальный вакцинный препарат, способный надежно защитить население с минимальными побочными эффектами. Объектом исследования были выбраны противопандемические вакцины разработки и выпуска 2009 г.: «Паненза» (Санofi Пастер, Франция), «МоноГриппол» (ООО «Петровакс»), а так же субстрат вакцины «МоноГриппол» (предоставленный НИИ вакцин и сывороток, Санкт-Петербург, Россия). Как было выявлено в результате исследований, высокая иммуногенность среди изученных вакцин наблюдалась у препарата «МоноГриппол». В результате изучения соотношения между иммуногенностью и протеиновым составом было выявлено его высокое значение у адъювантной вакцины «МоноГриппол», в качестве адъюванта которой использовался «Полиоксидоний», а также

субстрата этого препарата. Очевидно, указанное может служить подтверждением того, что именно адьювант влияет в конъюгированных препаратах на иммунный ответ, который они вызывают, вне зависимости от низкого содержания белка в их составе.

**Ключевые слова:** грипп, вакцины, адьювант

**УДК: 616.921.5:615.371:615.076(047.31)  
МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ ТА ОЦІНЮВАННЯ  
ГРИППОЗНИХ ВАКЦИН**

**Волянський А.Ю., Давидова Т.В., Кучма І.Ю.**

Найефективнішим методом керування розповсюдження та ускладнень інфекційних захворювань є вакцинопрофілактика. По цьому, для захворювання, яке здатне викликати епідемії та пандемії практично кожного року, наносячи велику шкоду здоров'ю людей та значні матеріальні збитки, важливо знайти найоптимальніший вакцинний препарат, що здатний надійно захистити населення з мінімальними побічними ефектами. Об'єктом дослідження обрано протипандемічні вакцини розробки та випуску 2009 р.: «Паненза» (Санofi Пастер, Франція), «МоноГриппол» (ООО «Петровакс»), субодичний субстрат вакцини «МоноГриппол» (що був наданий НДІ вакцин та сироваток, Санкт-Петербург, Росія). Було визначено та проаналізовано за допомогою молекулярно-біологічних методів їх білковий склад. Як було виявлено у результаті досліджень, найвища імуногенність серед вивчених вакцин спостерігалася у препарата «МоноГриппол». Вивчення співвідношення між імуногенністю та білковим вмістом у моновалентних вакцин виявило його високі значення у ад'ювантної вакцини «МоноГриппол», ад'ювантом якої є «Поліоксидоній», а також субстрату цього препарату. В очевидь, вказане може слугувати підтвердженням припущення, що саме ад'ювант впливає у кон'югованих препаратах на імунну відповідь, яку вони викликають, незалежно від низького вмісту білку у їх складі.

**Ключові слова:** грип, вакцини, ад'ювант

**UDC: 616.921.5:615.371:615.076(047.31)  
METHODS OF STUDY AND EVALUATION OF  
INFLUENZA VACCINE**

**Volyansky A. Yu., Davydova, T.V., Kuchma I.Yu.**

The most effective method of managing distribution and complications of infectious diseases is a vaccination. After this, for a disease that can cause epidemics and pandemics almost every year, causing great harm to human health and significant material damage, it is important to find the optimal vaccine preparation that can reliably protect people with minimal side effects. The object of study chosen antipandemic vaccine development and production 2009: "Panenza" (Sanofi Pasteur, France), "MonoHryppol" (OOO "Petrovaks"), subunit substrate vaccine "MonoHryppol" (Institute of Vaccines and Serums, St. Petersburg, Russia). Were identified and analyzed using molecular biological methods of protein structure. It was discovered as a

result of research, the highest among the studied immunogenicity of vaccines was observed in drug "MonoHryppol." Studying the relationship between immunogenicity and protein content in vaccines revealed its high value in the adjuvant vaccine "MonoHryppol" adjuvant which is "Polioksydoniy" and substrate. Obviously, the above can serve as confirmation of the assumption that this adjuvant effect of conjugated drugs on the immune response they cause, regardless of the low protein content in their composition.

**Key words:** flu, vaccines, adjuvant