

<https://doi.org/10.17116/molgen202038031136>

Исследование иммуногенности и протективных свойств рекомбинантной вакцины против гриппа

© Е.С. СЕДОВА¹, Л.А. СТЕПАНОВА², А.А. ЛЫСЕНКО¹, Д.Н. ШЕРБИНИН¹, Л.В. ВЕРХОВСКАЯ¹, Л.М. ЦЫБАЛОВА², М.М. ШМАРОВ^{1,3}

¹ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия;

²ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

³ООО «НТФАРМА», Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель исследования — доклиническое изучение иммуногенности и защитных свойств противогриппозной тривалентной вакцины AdeVac-Флю на лабораторных мышах.

Материал и методы. Вакцина AdeVac-Флю представляет собой смесь рекомбинантных аденовирусов человека пятого серотипа, экспрессирующих гены гемагглютининов вакцинных штаммов вируса гриппа A/California/07/2009(H1N1), A/Perth/16/2009(H3N2), B/Brisbane/60/2008, а также молекулярного адьюванта Иммуномакс. В качестве препарата сравнения была использована живая гриппозная вакцина Ультравак (ФГУП НПО «Микроген»). Для изучения защитных свойств вакцины мыши линии Balb/c были иммунизированы однократно интраназально и через 28 дней после иммунизации заражены летальными дозами вирусов гриппа А H1N1, H3N2 и В. Уровень вирусыведения из легких мышей был оценен на 3-и и 6-е сутки после заражения с помощью титрования гомогенатов легких на культуре клеток MDCK. Уровень специфических антител к вирусам гриппа определяли методами непрямого ИФА, РТГА и РВН.

Результаты. Было показано, что гриппозная тривалентная вакцина AdeVac-Флю™ является более иммуногенной, чем препарат сравнения. Уровень защиты от гомологичных штаммов вирусов гриппа либо чуть меньше, либо сравнимы с уровнем защиты препарата сравнения. При этом показано, что AdeVac-Флю так же, как и живая гриппозная вакцина, эффективно защищает мышей от гетерологичного штамма вируса гриппа, хотя у мышей и наблюдалось вирусыведение из легких и незначительное снижение массы тела (менее чем на 10%).

Заключение. Показано, что вакцина AdeVac-Флю на основе рекомбинантных аденовирусов человека 5-го серотипа, экспрессирующих гены гемагглютининов вирусов гриппа A/California/07/2009 (H1N1), A/Perth/16/2009 (H3N2), B/Brisbane/60/2008, обладает иммуногенностью и защитными свойствами по отношению как к гомологичным, так и гетерологичным (в пределах субтипа) штаммам вируса гриппа.

Ключевые слова: кандидатная гриппозная вакцина AdeVac-Флю™, иммуногенность, протективность, вирусы гриппа А и В.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Седова Е.С. — <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>; e-mail: sedovaes@yandex.ru

Степанова Л.А. — <https://orcid.org/0000-0002-8833-9409>

Лысенко А.А. — <https://orcid.org/0000-0002-0230-1822>

Щербинин Д.Н. — <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Верховская Л.В. — <https://orcid.org/0000-0002-4731-1629>

Цыбалова Л.М. — <https://orcid.org/0000-0002-1193-5907>

Шмаров М.М. — <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

Автор, ответственный за переписку: Седова Е.С. — e-mail: sedovaes@yandex.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Седова Е.С., Степанова Л.А., Лысенко А.А., Щербинин Д.Н., Верховская Л.В., Цыбалова Л.М., Шмаров М.М. Исследование иммуногенности и протективных свойств рекомбинантной вакцины против гриппа. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2020;38(3):136–144. <https://doi.org/10.17116/molgen202038031136>

Study of the immunogenicity and protective properties of recombinant influenza vaccine

© E.S. SEDOVA¹, L.A. STEPANOVA², A.A. LYSENKO¹, D.N. SHCHERBININ¹, L.V. VERKHOVSKAYA¹, L.M. TSYBALOVA², M.M. SHMAROV^{1,3}

¹Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia;

²Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia;

³LLC «NTfarma», Moscow, Russia

ABSTRACT

The aim. A preclinical study of the immunogenicity and protective properties of the influenza trivalent vaccine AdeVac-Flu™ in laboratory mice BALB/c strain.

Material and methods. The vaccine AdeVac-Flu™ is a mixture of recombinant human adenovirus 5 serotype encoding the hemagglutinin genes of influenza virus vaccine strains: A/California/07/2009 (H1N1), A/Perth/16/2009(H3N2), B/Brisbane/60/2008,

as well as the molecular adjuvant Immunomax. As a reference drug, was used the live influenza virus vaccine Ultravac, produced by the FSUE SPA «Microgen». Balb/c mice were immunized once with AdeVac-Flu™ intranasally and 28 days after immunization were infected with a lethal dose of influenza viruses A H1N1, H3N2 and influenza virus B. The level of virus accumulation in the lungs of infected mice was evaluated at 3 and 6 days after infection by titration the lung homogenates in MDCK cells. Evaluation of the humoral immune response to influenza viruses was performed by ELISA, HIA and VNA.

Results. It was shown that the influenza vaccine AdeVac-Flu™ is more immunogenic than the reference drug. Protection quality against homologous strains of influenza viruses via AdeVac-Flu™ are either slightly lower or comparable to the reference drug. At the same time, it was shown that AdeVac-Flu™, as well as a live influenza virus vaccine, protects mice from a heterologous strain of the influenza virus, despite the fact that mice immunized with AdeVac-Flu™ showed virus excretion from the lungs and a slight decrease in body weight (less than 10%).

Conclusions. AdeVac-Flu™ vaccine based on recombinant human adenoviruses 5 serotype encoding the hemagglutinin genes of influenza viruses A/California/07/2009(H1N1), A/Perth/16/2009(H3N2), B/Brisbane/60/2008, possesses immunogenicity and protective properties in relation to both homologous and heterologous (within the subtype) strains of the influenza virus.

Keywords: AdeVac-Flu™ candidate flu vaccine, immunogenicity, protection, influenza A and B viruses.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Sedova E.S. — <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>; e-mail: sedovaes@yandex.ru

Stepanova L.A. — <https://orcid.org/0000-0002-8833-9409>

Lysenko A.A. — <https://orcid.org/0000-0002-0230-1822>

Shcherbinin D.N. — <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Verkhovskaya L.V. — <https://orcid.org/0000-0002-4731-1629>

Tsybalova L.M. — <https://orcid.org/0000-0002-1193-5907>

Shmarov M.M. — <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

Corresponding author: Sedova E.S. — e-mail: sedovaes@yandex.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Sedova ES, Stepanova LA, Lysenko AA, Shcherbinin DN, Verkhovskaya LV, Tsybalova LM, Shmarov MM. Study of the immunogenicity and protective properties of recombinant influenza vaccine. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)*. 2020;38(3):136–144. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/molgen202038031136>

Грипп — высококонтагиозное заболевание, возбудителями которого являются РНК-содержащие вирусы, относящиеся к семейству Orthomyxoviridae. Ежегодные эпидемии вызывают вирусы гриппа, относящиеся к группам А и В, причем среди людей в настоящее время циркулируют вирусы гриппа А субтипов H1N1 и H3N2 [1]. Главным методом профилактики гриппа является вакцинация. Показано, что основным антигеном вируса гриппа, вызывающим формирование нейтрализующих антител, является гемагглютинин. Профилактический эффект современных вакцин основан главным образом на выработке протективных антител именно к этому поверхностному антигену [2]. Однако современные противогриппозные вакцины являются штамм-специфичными. Благодаря антигенному дрейфу состав циркулирующих среди населения вирусов гриппа постоянно меняется, что обуславливает необходимость ежегодного обновления штаммового состава противогриппозных вакцин [3].

Одной из возможных стратегий, позволяющих расширить спектр действия противогриппозных вакцин, является так называемая генетическая вакцинация. Генетические вакцины обеспечивают попадание генетического материала инфекционного агента в клетки хозяина и экспрессию в них генов белков патогена. В результате белки патогена распознаются иммунной системой, что приводит к индукции как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. При этом структура целевых антигенов максимально близка к их нативной структуре и позволяет добиться более ши-

рокого иммунного ответа [4]. Одним из наиболее популярных направлений в создании генетических вакцин являются вакцины на основе аденовирусов человека пятого серотипа (Ад5) [5]. Показано, что генетические вакцины на основе аденовирусов, несущие ген гемагглютинина вируса гриппа А, способны индуцировать перекрестный иммунитет как в пределах одного субтипа вируса гриппа А [6], так и между разными субтипами [7]. Ранее нами было показано, что иммунизация лабораторных мышей рекомбинантным аденовирусом (рАд5), несущим ген гемагглютинина вируса гриппа H5N2, обеспечивает индукцию протективного иммунного ответа как против вируса гриппа субтипа H5N1, так и против вируса гриппа субтипа H1N1, относящегося к той же филогенетической группе [8], но не обеспечивает защиту мышей против вируса гриппа субтипа H3N2, относящегося к другой группе [9]. Таким образом, создание кандидатных вакцин на основе рАд5, экспрессирующих гемагглютинины вирусов гриппа А и В, может позволить добиться более широкого иммунного ответа и уйти от необходимости ежегодной ревакцинации населения. Кроме того, такие вакцины позволяют отказаться от работы непосредственно с патогеном при производстве, а также включить в программу по вакцинации людей, страдающих аллергией на белки куриных яиц и не имеющих возможности вакцинироваться препаратами, в состав которых входят вирусы гриппа (или их компоненты), накопленные в куриных эмбрионах.

Цель исследования — доклиническое изучение иммуногенности и протективных свойств противо-

гриппозной тривалентной вакцины АдеВак-Флю на лабораторных животных. Вакцина АдеВак-Флю представляет собой смесь рАд5, экспрессирующих гены гемагглютининов вакцинных штаммов вируса гриппа А/California/07/2009(Н1N1), А/Perth/16/2009(Н3N2), В/Brisbane/60/2008, а также молекулярный адьювант Иммуномакс, позволяющий существенно увеличить уровень экспрессии трансгена аденовирусным вектором [10–12].

Материал и методы

Генноинженерная кандидатная гриппозная вакцина АдеВак-Флю. Вакцина представляет собой смесь рАд5, экспрессирующих гены гемагглютинина вакцинных штаммов вирусов гриппа: А/California/07/2009(Н1N1), А/Perth/16/2009(Н3N2), В/Brisbane/60/2008 с активностью $2 \cdot 10^7$ БОЕ/мл каждого штамма на 1 прививочную дозу (в 0,5 мл) с добавлением в качестве молекулярного адьюванта Иммуномакс в количестве 100 ЕД и стабилизирующего буфера. РАд5 были получены как описано ранее [9]. Вакцина произведена ООО «Иммафарма», Россия по заказу ООО «НТФарма», Россия.

Препарат сравнения. В качестве препарата сравнения была выбрана коммерческая живая гриппозная вакцина (ЖГВ) Ультравак производства ФГУП НПО «Микроген». ЖГВ является лиофилизатом для приготовления раствора для интраназального введения, одна ампула (0,5 мл) содержит 1 дозу вакцины. В одной прививочной дозе содержатся реассортантные вирусы гриппа А/California/07/2009(Н1N1), А/Perth/16/2009(Н3N2) — $10^{6,9}$ ЭИД₅₀ и В/Brisbane/60/2008 — $10^{6,4}$ ЭИД₅₀.

Животные. В работе использовали мышей линии Balb/c (самки), массой 16–18 г, полученных из питомника «Столбовая» ГУ научный центр биомедицинских технологий РАМН. Животных содержали в виварии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России в соответствии с действующими правилами.

Иммунизация. Были сформированы три группы животных по 40 особей. Мышам 1-й группы вводили вакцину АдеВак-Флю интраназально дискретно с интервалами 15 мин в общем объеме 0,5 мл (одна доза). Мышей 2-й опытной группы иммунизировали ЖГВ интраназально одной дозой человека, разбитой на 2 введения с интервалом 2 нед. Контрольная группа мышей получила интраназально PBS (фосфатно-солевой буфер, рН 7,2) в объеме 100 мкл.

На 28-е сутки после иммунизации у части мышей в каждой группе отбирали кровь, бронхоальвеолярные лаважи и назальные смывы. Оставшихся мышей заражали вирусами гриппа А и В.

Получение сывороток. Образцы крови получали от 5 мышей каждой группы на 28-й день после иммунизации. Для получения сыворотки кровь инкуби-

ровали в течение 30 мин при 37 °С. После образования сгустков крови образцы центрифугировали в течение 15 мин при 400 g, аликвотировали и замораживали при температуре –20 °С.

Получение назальных смывов и бронхоальвеолярных лаважей (БАЛ). Назальные смывы и БАЛ получали от 5 мышей каждой группы на 28-й день после иммунизации после умерщвления животных в атмосфере углекислого газа. Труп животного фиксировали на операционном столике брюшком вверх. Производили разрез кожи по средней линии от нижней челюсти. В верхнюю часть трахеи при помощи зонда вводили 1 мл PBS (рН 7,2) и собирали жидкость через носовые ходы. Промывание проводили 2–3 раза. В нижнюю часть трахеи в направлении легких вводили катетер на глубину 3–5 мм. Дважды промывали бронхи и легкие 1 мл PBS (рН 7,2). Смывы и БАЛ центрифугировали 15 мин при 400 g, аликвотировали и замораживали при температуре –20 °С.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Для оценки иммуногенности вакцины АдеВак-Флю в РТГА использовали вирусы гриппа А/California/07/2009(Н1N1), А/Perth/16/2009(Н3N2), В/Brisbane/60/2008. РТГА проводили согласно М.У. 3.3.2.175803 [13].

Реакция вируснейтрализации (РВН). Для проведения РВН использовали вирусы гриппа А/California/07/2009(Н1N1), А/Perth/16/2009(Н3N2), В/Brisbane/60/2008. Реакцию проводили на клеточной культуре МДСК. Реакцию нейтрализации ставили в соответствии с М.У. [14].

Иммуноферментный анализ (ИФА). ИФА проводили общепринятым методом [15, 16], в качестве антигенов использовали очищенные гемагглютинины вирусов гриппа А/California/07/2009(Н1N1), В/Brisbane/60/2008, А/Perth/16/2009(Н3N2). К сорбированым на планшете антигенам добавляли исследуемые сыворотки, БАЛ или назальные смывы. После отмывки в лунки планшета добавляли антитела к Ig мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена. В качестве субстрата использовали тетраметилбензидин (ТМБ). Учет реакции проводили при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, которое дает оптическую плотность, по крайней мере, в 2 раза больше, чем образец от неиммунизированных мышей в том же разведении.

Вирусы и заражение мышей. Через 28 дней после иммунизации мыши были заражены следующими вирусами: А/California/07/2009(Н1N1) — 15 мышей, В/Brisbane/60/2008 — 5 и А/Aichi/2/68(Н3N2) — 15. Вирусы вводили интраназально под легким эфирным наркозом в объеме 50 мкл/мышь в дозе 10ЛД₅₀ для вирусов А/California/07/2009(Н1N1) и А/Aichi/2/68(Н3N2) и 3,5 IgМИД (мышьяная инфекционная доза) для В/Brisbane/60/2008. Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 дней.

Таблица 1. СГТ к вирусам гриппа в сыворотках крови, БАЛ и назальных смывах мышей, выявленные с помощью ИФА

Группа	Антиген	IgG в сыворотке	IgA	
			в назальных смывах	в БАЛ
АдеВак-Флю	A/California/07/2009 (H1N1)	409 600,00±112 177,00	34,00±13,23	2336,00±1032,47*
	A/Perth/16/2009 (H3N2)	1 060 960,00±243 435,20*	122,40±55,36*	3072,00±591,21*
	B/Brisbane/60/2008	143 360,00±25 083,54*	24,40±11,11	576,00±161,07*
ЖГВ	A/California/07/2009 (H1N1)	137 384,00±61 441,86	4,00±1,09	72,00±24,53
	A/Perth/16/2009 (H3N2)	19 200,00±10 772,82	5,20±1,19	34,40±13,00
	B/Brisbane/60/2008	19 412,16±8681,65	4,00±1,09	65,60±18,99

Примечание. Здесь и в табл. 2—4: * — различия между группами достоверны, $p < 0,05$.

Вирусовыделение из легких мышей. Легкие 5 мышей из каждой группы, извлеченные на 4-е сутки после заражения, гомогенизировали в 10-кратном объеме стерильного PBS и готовили из гомогенатов серию 10-кратных разведений на том же буфере. При определении титра вируса гриппа использовали культуру клеток MDCK, выращенных на 96 луночных планшетах на среде MEM. Клетки заражали серийными 10-кратными разведениями легочного гомогената от 10^0 до 10^{-7} и инкубировали в термостате в течение 72 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость переносили в лунки планшета для иммунологических реакций, после чего добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Уровень репродукции вируса в лунках панели оценивали по реакции гемагглютинации (РГА) эритроцитов. Инфекционную активность вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в $IgTCID_{50}$.

Статистическая обработка данных

Статистическую значимость различий титров специфических антител в сыворотках, назальных смывах и БАЛ оценивали с использованием U-критерия Манна—Уитни. Динамика изменения массы тела оценивалась с использованием программы GraphPadPrismv. Сравнение показателей выживаемости в различных группах мышей — с использованием тестов Mantel—Cox (log-rank) и Gehan—Breslow—Wilcoxon.

Результаты и обсуждение

Иммуногенность кандидатной гриппозной вакцины АдеВак-Флю. Для оценки иммуногенности вакцины в сыворотках крови иммунизированных животных на 28-й день после иммунизации определяли титры специфических антител изотипа IgG в ИФА, титры гемагглютинирующих антител в РТГА и титры нейтрализующих антител в РВН к штаммам вирусов гриппа A/California/07/09(H1N1), A/Perth/16/2009(H3N2) и B/Brisbane/60/2008. В назальных смывах и БАЛ определяли содержание специфических секреторных IgA к тем же штаммам.

На 28-е сутки после иммунизации АдеВак-Флю и ЖГВ средние геометрические титры (СГТ) специфических антител IgG, полученных в ИФА, к гемагглютинирующему вирусу гриппа H1N1 составили $409 600,00 \pm 112 177,00$ и $137 384,00 \pm 61 441,86$ соответственно. Достоверных различий в уровнях IgG между иммунизированными группами выявлено не было ($p > 0,05$). СГТ сывороточных IgG к гемагглютинирующему вирусу гриппа A/Perth/16/2009(H3N2) у мышей, иммунизированных АдеВак-Флю, был достоверно выше ($p < 0,01$), чем у мышей, получавших ЖГВ, и составил $1 060 960,00 \pm 243 435,20$ и $19 200,00 \pm 10 772,82$. СГТ IgG к гемагглютинирующему вирусу гриппа B/Brisbane/60/2008 составили $143 360,00 \pm 25 083,54$ для группы АдеВак-Флю и $19 412,16 \pm 8681,65$ для группы ЖГВ ($p < 0,01$) (табл. 1).

В РТГА выявлено, что средний СГТ гемагглютинирующих антител к вирусу гриппа H1N1 на 28-е сутки у мышей, получивших АдеВак-Флю, составил 900,0 по сравнению с 20,0 у мышей, иммунизированных ЖГВ ($p < 0,01$). В РВН показано, что к 28-му дню наблюдения выявлялся высокий уровень нейтрализующих вирус гриппа H1N1 антител, и СГТ в группе АдеВак-Флю составил 735,2, что достоверно выше ($p < 0,01$), чем у мышей, иммунизированных ЖГВ (СГТ=30,3). Данные представлены в табл. 2.

В табл. 3 представлены результаты по определению гемагглютинирующих и нейтрализующих антител к вирусу гриппа H3N2. СГТ в РТГА для мышей группы АдеВак-Флю составил 1689,00, а у мышей, получавших ЖГВ, СГТ составил 22. В РВН показано, что уровень нейтрализующих антител к вирусу гриппа H3N2 у мышей, получавших АдеВак-Флю, составил 696,4 и был достоверно выше ($p < 0,01$), чем у мышей, получавших ЖГВ, — 60,6.

В табл. 4 представлены результаты РТГА и РВН сывороток крови мышей с вирусом гриппа B/Brisbane/60/2008. Выявлено, что к 28-му дню у мышей группы АдеВак-Флю СГТ в РТГА составил 40,0, что значительно выше, чем у мышей, получавших ЖГВ, у которых титр в РТГА практически не отличался от контроля. В РВН выявлена достоверная разница в содержании нейтрализующих антител у мышей, получавших АдеВак-Флю и ЖГВ ($p < 0,05$). СГТ для группы АдеВак-Флю составил 95,1, что

Таблица 2. Титры антител к вирусу гриппа A/California/07/2009 (H1N1) в сыворотках крови мышей, выявленные с помощью РТГА и РВН

Группа	№ мыши	Антиген	Титры антител	
			в РТГА	в РВН
АдеВак-Флю	1	A/California/07/2009 (H1N1)	640	640
	2		640	640
	3		640	640
	4		640	640
	5		1280	1280
СГТ			900,0*	735,2*
ЖГВ	1		40	40
	2		80	80
	3		40	40
	4		20	20
	5		<20	<20
СГТ			20,0	30,3
Контроль			<8	<8

Таблица 3. Титры антител к вирусу гриппа A/Perth/16/2009(H3N2) в сыворотках крови мышей, выявленные с помощью РТГА и РВН

Группа	№ мыши	Антиген	Титры антител	
			в РТГА	в РВН
АдеВак-Флю	1	A/Perth/16/2009 (H3N2)	640	400
	2		1280	800
	3		1280	400
	4		2560	800
	5		5120	1600
СГТ			1689,0*	696,4*
ЖГВ	1		20	40
	2		40	40
	3		20	80
	4		20	80
	5		<20	80
СГТ			22	60,6
Контроль			<10	<8

Таблица 4. Титры антител к вирусу гриппа B/Brisbane/60/2008 в сыворотках крови мышей, полученные с помощью РТГА и РВН

Группа	№ мыши	Антиген	Титры антител	
			в РТГА	в РВН
АдеВак-Флю	1	B/Brisbane/60/2008	<20	80
	2		80	80
	3		160	80
	4		<20	160
	5		80	—
СГТ			40,0	95,1*
ЖГВ	1		20	20
	2		<20	20
	3		<20	20
	4		<20	40
	5		<20	40
СГТ			<20	26,4
Контроль			<10	<8

Таблица 5. Вирусывыделение из легких мышей на 4-е сутки после заражения вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1) в дозе 10ЛД₅₀

Группа	Доза заражения вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1), ЛД ₅₀	Репродукция в легких, lgТЦД ₅₀
АдеВак-Флю TM	10	≤0,5*
ЖГВ	10	≤0,5*
Контроль	10	≥8,5

Примечание. Здесь и в табл 6 и 7: * — достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,01$).

Таблица 6. Вирусывыделение из легких мышей на 4-е сутки после заражения вирусом гриппа A/Aichi/2/68(H3N2) в дозе 10 ЛД₅₀

Группа	Доза заражения вирусом гриппа A/Aichi/2/68(H3N2), ЛД ₅₀	Репродукция в легких, lgТЦД ₅₀
АдеВак-Флю	10	5,95±1,44*
ЖГВ	10	4,15±1,33*
Контроль	10	8,2±0,4

было более чем в 3 раза выше, чем у группы ЖГВ (СГТ=26,4).

Содержание секреторного IgA к вирусам гриппа A/H1N1, A/H3N2 и B в назальных смывах и БАЛ иммунизированных животных представлено в табл. 1. К 28-м суткам уровень секреторного IgA у мышей, иммунизированных вакциной АдеВак-ФлюTM, к вирусу H1N1 был достоверно выше, чем у мышей, получавших ЖГВ: 34,00±13,23 и 4,00±1,09 ($p=0,05$) для назальных смывов и 2336,00±1032,47 и 72,00±24,53 ($p < 0,05$) для БАЛ соответственно.

Содержание IgA к вирусу H3N2 в назальных смывах мышей группы АдеВак-Флю также было достоверно выше, чем в группе ЖГВ (122,40±55,36 и 5,20±1,19 соответственно, $p < 0,05$). Уровень IgA в БАЛ мышей, получавших АдеВак-Флю, был достоверно выше, чем у мышей, иммунизированных ЖГВ, и составил 3072,00±591,21 и 34,40±13,00 ($p=0,01$) соответственно.

Содержание IgA к вирусу гриппа B в назальных смывах мышей, иммунизированных АдеВак-Флю, было в 6 раз выше, чем у мышей, получавших ЖГВ, и составило в среднем 24,40±11,11 и 4,00±1,09 соответственно ($p=0,05$). Уровень секреторных IgA в БАЛ у группы АдеВак-Флю был достоверно выше, чем у группы ЖГВ. СГТ составил 576,00±161,07 и 65,60±18,99 соответственно ($p < 0,01$).

Протективность гриппозной вакцины АдеВак-Флю

Динамика изменения массы тела и гибели мышей после заражения вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1) в дозе 10 ЛД₅₀ представлена на рис. 1. Различия в выживаемости между мышами, получавшими АдеВак-Флю и ЖГВ, были статистически незначимыми, не было значительной потери массы тела после заражения животных. В контроле падение массы тела достигало 40%. Протективность в группе мышей, иммунизированных АдеВак-Флю, составила 80%, а в группе, получавшей ЖГВ, — 90%.

Результаты определения инфекционного титра вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1) в легочной ткани мышей на 4-е сутки после заражения представлены в табл. 5. Из табл. 5 видно, что у мышей, иммунизированных АдеВак-Флю и ЖГВ, не происходит выделения вируса из легких в отличие от контроля, где содержание вируса составило больше 8,5 lgТЦД₅₀.

Высокий уровень ингибиторчувствительности вируса гриппа A/Perth/16/2009 (H3N2) не позволил использовать его для оценки протективности, поэтому заражение проводилось вирусом гриппа A/Aichi/2/68(H3N2) в дозе 10 ЛД₅₀ (гетерологичное заражение). Динамика изменения массы тела и гибели мышей опытных и контрольной групп после заражения вирусом гриппа A/Aichi/2/68/ (H3N2) представлена на рис. 2. Различия в выживаемости между группами АдеВак-Флю и ЖГВ были статистически незначимы. Не было значительной потери массы тела, тогда как в контроле падение массы тела достигало 30% от исходной. Протективность в группе мышей, иммунизированных АдеВак-Флю, составила 90%, а в группе, получавшей ЖГВ, — 100%.

Определение уровня вируса гриппа в легких мышей на 4-е сутки после заражения показало (табл. 6), что в легких мышей обеих групп наблюдается выделение вируса, но оно было достоверно ниже ($p < 0,01$), чем в контроле.

Вирус гриппа B/Brisbane/60/2008 вводили животным в дозе 2,5 lgМИД, поскольку он не был летальным для мышей. Поэтому различия в динамике изменения массы тела и гибели мышей опытных и контрольной групп не являлись значимыми и информативными. Различий в состоянии животных в группах АдеВак-Флю и ЖГВ выявлено не было (данные не представлены).

Основным показателем протективного действия в случае вируса B/Brisbane/60/2008 являлось вирусывыделение из легких мышей. Вирус гриппа не был выделен из легких ни у одной мыши, ни в группе

Таблица 7. Вирусовыделение из легких на 4-е сутки после заражения вирусом гриппа В/Brisbane/60/2008 в дозе 2,5 IgМИД

Группа	Доза заражения вирусом гриппа В/Brisbane/60/2008, IgМИД	Репродукция в легких, IgТЦД ₅₀
АдеВак-Флю	2,5	≤0,5*
ЖГВ	2,5	≤0,5*
Контроль	2,5	2,6±1,02

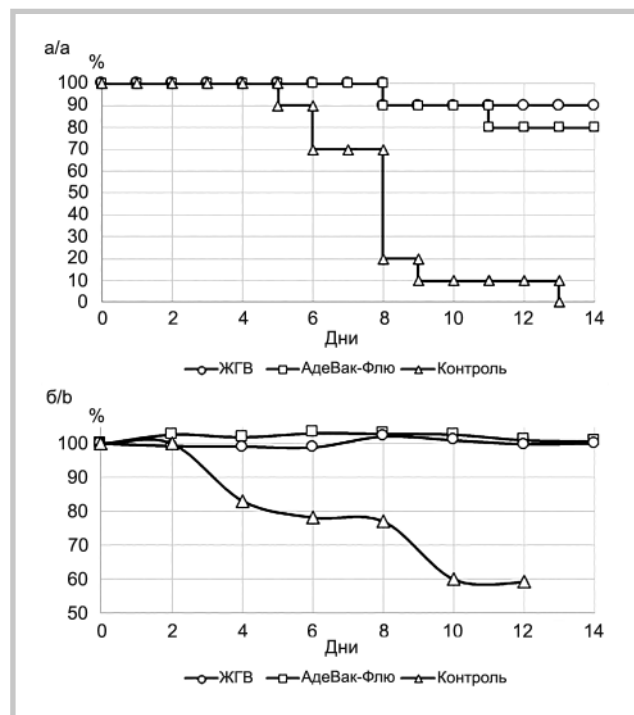


Рис. 1. Анализ протективности иммунного ответа мышей, иммунизированных вакциной АдеВак-Флю или ЖГВ, с последующим заражением летальной дозой вируса гриппа А/California/07/2009(Н1N1).

а — выживаемость мышей, зараженных летальной дозой (10 ЛД₅₀) вируса гриппа А/California/07/2009(Н1N1). Мыши были однократно интраназально иммунизированы АдеВак-Флю и ЖГВ. В качестве контроля использовали мышей, иммунизированных фосфатным буфером PBS. По оси ординат — % выживших животных, по оси абсцисс — дни с момента заражения. Различия между выживаемостью в группах АдеВак-Флю, ЖГВ и контрольной группой PBS являются статистически достоверными ($p < 0,05$); б — изменение массы тела мышей, зараженных летальной дозой (10 ЛД₅₀) вируса гриппа штамма А/California/07/2009(Н1N1). По оси ординат — изменение массы тела животных в %, по оси абсцисс — дни с момента заражения.

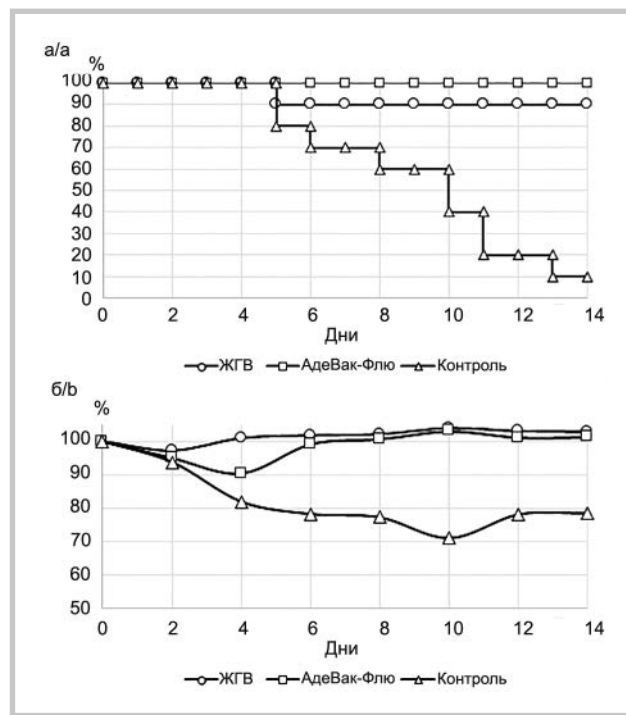


Рис. 2. Анализ протективности иммунного ответа мышей, иммунизированных вакциной АдеВак-Флю и ЖГВ, с последующим заражением летальной дозой вируса гриппа А/Aichi/2/68(Н3N2).

а — выживаемость мышей, зараженных летальной дозой (10 ЛД₅₀) вируса гриппа А/Aichi/2/68(Н3N2). Мыши были однократно интраназально иммунизированы АдеВак-Флю и ЖГВ. В качестве контроля использовали мышей, иммунизированных фосфатным буфером PBS. По оси ординат — % выживших животных, по оси абсцисс — дни с момента заражения. Различия между выживаемостью в группах АдеВак-Флю, ЖГВ и контрольной группой PBS являются статистически достоверными ($p < 0,05$); б — изменение массы тела мышей, зараженных летальной дозой (10 ЛД₅₀) вируса гриппа штамма А/Aichi/2/68(Н3N2). По оси ординат — изменение массы тела животных в %, по оси абсцисс — дни с момента заражения.

ЖГВ, ни в группе АдеВак-Флю (табл. 7). При этом средний титр вируса в контрольной группе составил 2,6 IgТЦД₅₀. Различия между опытными и контрольной группами были достоверными ($p < 0,01$).

Заключение

Иммуногенность и защитные свойства гриппозной тривалентной вакцины АдеВак-Флю на основе рAd5, экспрессирующих гены гемагглютининов вирусов гриппа А/California/07/2009(Н1N1), А/

Perth/16/2009(Н3N2), В/Brisbane/60/2008, изучены при однократном интраназальном введении мышам линии Valb/c. В качестве препарата сравнения использовали коммерческую ЖГВ Ультравак (ФГУП «НПО "Микроген"»). Результаты изучения иммуногенности показали, что однократная иммунизация гриппозной вакциной АдеВак-Флю приводит к формированию выраженного специфического гуморального (в том числе местного) иммунитета с образованием высоких титров гемагглютинирующих и нейтрализующих антител. При этом иммуногенность

гриппозной вакцины АдеВак-Флю была значительно выше, чем иммуногенность препарата сравнения. Титры IgG к вирусу гриппа A/California/07/2009(H1N1) в сыворотке крови после иммунизации мышей АдеВак-Флю были более чем в 2 раза выше, чем после иммунизации ЖГВ. Содержание гемагглютинирующих и нейтрализующих антител было в 5—7 раз выше, чем у мышей, получавших ЖГВ. Разница в уровнях секреторных IgA в назальных смывах и БАЛ между этими группами была соответственно в 32 и 8,5 раза больше. Различия в иммуногенности гриппозной вакцины АдеВак-Флю™ и ЖГВ к вирусу гриппа A/Perth/16/2009(H3N2) были еще более выражены. Уровни специфических IgG в сыворотке крови у мышей, получивших гриппозную вакцину АдеВак-Флю, были в 55 раз выше, чем у мышей, иммунизированных ЖГВ. Титры гемагглютинирующих и нейтрализующих антител в группе АдеВак-Флю в 10—100 раз выше, чем в группе ЖГВ. Титры секреторных IgA в назальных смывах и БАЛ между группами различаются в 90 и 25 раз соответственно. К вирусу гриппа B/Brisbane/60/2008 титры IgG в сыворотке крови в 7 раз выше у мышей, иммунизированных АдеВак-Флю, чем ЖГВ. А по отношению к IgA в назальных смывах и БАЛ эта разница составляет 9 и 8 раз. Следует отметить, что иммуногенность разных компонентов в составе гриппозной вакцины АдеВак-Флю существенно различается. Наибольшей иммуногенностью в составе гриппозной вакцины АдеВак-Флю обладали Ад5, экспрессирующие ген гемагглютинаина A/Perth/16/2009(H3N2), наименьшей — ген гемагглютинаина B/Brisbane/60/2008.

Для оценки протективности гриппозной вакцины АдеВак-Флю на 28-е сутки после начала опыта мышей заражали гомологичными вирусами гриппа A/California/07/2009(H1N1) (в дозе 10 ЛД₅₀) и B/Brisbane/60/2008 (в дозе 2,5 lgМИД). Для оценки защиты от вируса гриппа H3N2 проводилось заражение иммунизированных мышей антигенно отличающимся вариантом A/Aichi/2/68(H3N2) в дозе 10 ЛД₅₀ (гетерологичное заражение). Следует отметить, что вирус гриппа A/Aichi/2/68(H3N2) имеет только 86,1% гомологии с вирусом гриппа A/Perth/16/2009(H3N2). При этом 19 значимых аминокислотных замен приходятся на антигенные сайты в составе гемагглютинаина.

Протективность АдеВак-Флю против вируса гриппа A/California/07/2009(H1N1) составила 80%, тогда как ЖГВ — 90%. Динамика изменения массы

тела животных опытных групп была практически одинаковой, не было значительной потери массы тела после заражения в отличие от контроля. Как в группе АдеВак-Флю, так и в группе ЖГВ не наблюдалось выделения вируса из легких.

Протективность АдеВак-Флю к вирусу гриппа V/Brisbane/60/2008 не удалось показать на модели летальной гриппозной инфекции. Основным показателем считалось вирусывыделение из легких мышей. Показано, что заражающий вирус не был выделен из легких ни у одной мыши ни в группе ЖГВ, ни в группе АдеВак-Флю.

После заражения иммунизированных мышей гетерологичным штаммом вируса гриппа A/Aichi/2/68(H3N2) обе вакцины показали хорошую протективность (90—100%), несмотря на то, что в обеих опытных группах гетерологичный вирус выделялся из легких мышей на 4-е сутки после заражения, но в значительно меньших титрах, чем у мышей контрольных групп.

Таким образом, гриппозная тривалентная вакцина АдеВак-Флю является более иммуногенной, чем живая гриппозная вакцина. Уровни защиты от гомологичных штаммов вирусов гриппа были сопоставимы с уровнями защиты при иммунизации ЖГВ. При этом показано, что АдеВак-Флю так же, как и ЖГВ, эффективно защищает мышей от гетерологичного штамма вируса гриппа, хотя у мышей и наблюдалось вирусывыделение из легких и незначительное снижение массы тела (менее чем на 10%).

Итак, можно сделать вывод, что вакцина АдеВак-Флю на основе рекомбинантных аденовирусов человека 5-го серотипа, экспрессирующих гены гемагглютинаина вирусов гриппа A/California/07/2009(H1N1), A/Perth/16/2009(H3N2), B/Brisbane/60/2008, обладает высокой иммуногенностью и протективными свойствами по отношению как к гомологичным, так и к гетерологичным (в пределах субтипа) штаммам вируса гриппа.

Информация о соблюдении стандартов работы с животными. Содержание лабораторных животных происходило согласно ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Paules C, Subbarao K. Influenza. *Lancet*. 2017;390:697-708. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30129-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30129-0)
2. Zhang Y, Xu C, Zhang H, Liu GD, Xue C, Cao Y. Targeting Hemagglutinin: Approaches for Broad Protection against the Influenza A Virus. *Viruses*. 2019;11(5):E405. <https://doi.org/10.3390/v11050405>
3. Седова Е.С., Шербинин Д.Н., Мигунов А.И., Смирнов Ю.А., Логунов Д.Ю., Шмаров М.М., и др. Гриппозные рекомбинантные вакцины. *Acta Naturae*. 2012;4(4(15)):17-27. Sedova ES, Shcherbinin DN, Migunov AI, Smirnov YuA, Logunov DYU, Shmarov MM, et al. Recombinant influenza vaccines. *Acta Naturae*. 2012;4(4):17-27. (In Russ.).

4. Tompkins SM, Lin Y, Leser GP, Kramer KA, Haas DL, Howarth EW, et al. Recombinant parainfluenza virus 5 (PIV5) expressing the influenza A virus hemagglutinin provides immunity in mice to influenza A virus challenge. *Virology*. 2007;362:139-150. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.12.005>
5. Ertl HC. Viral vectors as vaccine carriers. *Curr Opin Virol*. 2016;21:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.06.001>
6. Hoelscher MA, Singh N, Garg S, Jayashankar L, Veguilla V, Pandey A, et al. A broadly protective vaccine against globally dispersed clade 1 and clade 2 H5N1 influenza viruses. *Infect Dis*. 2008;197(8):1185-1188. <https://doi.org/10.1086/529522>
7. Melidou A, Gioula G, Exindari M, Chatzidimitriou D, Diza-Mataftsi E. Influenza A(H5N1): an overview of the current situation. *Eurosurveillance*. 2009;14(20). <https://doi.org/10.2807/ese.14.20.19216-en>
8. Throsby M, van den Brink E, Jongeneelen M, Poon LL, Alard P, Cornelissen L, et al. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells. *PLoS One*. 2008;3(12):e3942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003942>
9. Шмаров М.М., Седова Е.С., Верховская Л.В., Руднева И.А., Богачева Е.А., Барыкова Ю.А., и др. Индукция протективного гетеросубтипического иммунного ответа против вируса гриппа при иммунизации рекомбинантными аденовирусными векторами, экспрессирующими гемагглютинин вируса гриппа Н5. *Acta Naturae*. 2010;2(1(4)):119-126. Shmarov MM, Sedova ES, Verkhovskaya LV, Rudneva IA, Bogacheva EA, Barykova YA, et al. Induction of a Protective Heterosubtypic Immune Response Against the Influenza Virus by using Recombinant Adenoviral Vectors Expressing Hemagglutinin of the Influenza H5 Virus. *Acta Naturae*. 2010;2(1):111-118. (In Russ.).
10. Атауллаханов Р.И., Пичугин А.В., Шишкова Н.М., Мастернак Т.Б., Малкина Е.Ю., Ульянова Л.И. и др. Клеточные механизмы иммуномодулирующего действия препарата Иммуномакс. *Иммунология*. 2005;26(2):111-120. Ataulakhonov RI, Pichugin AV, Shishkova NM, Masternak TB, Malkina EYu, Ulyanova LI, et al. Cell mechanisms of the immunomodulating action produced by drug «Immunomax». *Immunologiya*. 2005;26(2):111-120. (In Russ.).
11. Багаев А.В., Пичугин А.В., Лебедева Е.С., Лысенко А.А., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю. и др. Регуляция экспрессии целевого белка (трансгена) в составе ДНК аденовирусного вектора с помощью агонистов toll-подобных рецепторов. *Acta Naturae*. 2014;6(4(23)):29-42. Bagaev AV, Pichugin AV, Lebedeva ES, Lysenko AA, Shmarov MM, Logunov DY, et al. Regulation of the target protein (transgene) expression in the adenovirus vector using agonists of toll-like receptor. *Acta Naturae*. 2014;6(4):27-39. (In Russ.).
12. Багаев А.В., Пичугин А.В., Лебедева Е.С., Лысенко А.А., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю. и др. Влияние TLR-агонистов на экспрессию в антигенпрезентирующих клетках целевого белка-антигена, закодированного в аденовирусном векторе. *Иммунология*. 2015;36(4):188-195. Bagaev AV, Pichugin AV, Lebedeva ES, Lysenko AA, Shmarov MM, Logunov DY, et al. Influence of TLR-agonists on expression by antigen-presenting cells of the target protein antigen encoded in adenoviral vector. *Immunologiya*. 2015;36(4):188-195. (In Russ.).
13. Методические указания 3.3.2.1758—03 «Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа». М. 2003. Guidelines MU 3.3.2.1758—03 «Methods for determining the quality indicators of immunobiological drugs for the prevention and diagnosis of influenza». М. 2003. (In Russ.).
14. Методические рекомендации «Выявление антител к вирусам гриппа А(H5N1) в сыворотках людей и животных при естественной инфекции и вакцинальном процессе в реакции микронейтрализации». М. 2009. Methodical recommendations «Detection of antibodies to influenza A(H5N1) in the sera of humans and animals under natural infection and vaccination process in the reaction of microneutralization». М. 2009. (In Russ.).
15. Степанова Л.А., Сергеева М.В., Шуклина М.А., Шалдзян А.А., Потапчук М.В., Коротков А.В., и др. Гибридный белок на основе второй субъединицы гемагглютинина вирусов гриппа А/H2N2 формирует перекрестный иммунитет. *Acta Naturae*. 2016;8(2):129-140. Stepanova LA, Sergeeva MV, Shuklina MA, Shaldzhyan AA, Potapchuk MV, Korotkov AV, et al. A Fusion Protein Based on the Second Subunit of Hemagglutinin of Influenza A/H2N2 Viruses Provides Cross Immunity. *Acta Naturae*. 2016;8:116-26. (In Russ.).
16. Тутыкхина ИЛ, Седова ЕС, Грибова ИY, Иванова ТI, Василев ЛA, Рутовская МV. Passive immunization with a recombinant adenovirus expressing an HA (H5)-specific single-domain antibody protects mice from lethal influenza infection. *Antiviral Res*. 2013;97:318-328. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.12.021>

Поступила в редакцию 27.09.2019

Received 27.09.2019

После доработки 18.10.2019

Revised 18.10.2019

Принята к публикации 20.10.2019

Accepted 20.10.2019