

На правах рукописи

Хантимирова Лейсан Маратовна

ПОЛУЧЕНИЕ ХИТОЗАНА, ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ, ИЗУЧЕНИЕ ИХ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И
ИММУНОАДЪЮВАНТНОЙ АКТИВНОСТИ В СОСТАВЕ
ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА

03.02.02 – Вирусология

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН» Институт биоинженерии (ФИЦ Биотехнологии РАН) в лаборатории инженерии биополимеров, г. Москва и в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова) в отделе вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе, г. Москва

Научные руководители:

кандидат биологических наук,

Васильев Юрий Михайлович

кандидат химических наук,

Ильина Алла Викторовна

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится «__»_____2019 г. в ___ час__ мин на заседании Диссертационного совета Д.001.043.01 на базе ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17), тел. (812) 499 15 04, e-mail: sovet@influenza.spb.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17); <http://www.influenza.spb.ru>.

Автореферат разослан «__»_____2019 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д.001.043.01,

кандидат биологических наук

Амосова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Актуальность гриппа для здравоохранения на современном этапе трудно переоценить. По данным экспертов ВОЗ ежегодно гриппом переболевает до 10% взрослого населения и до 30% детей [WHO, 2018]. Сезонные эпидемии гриппа приводят к большому количеству госпитализаций и летальных исходов, особенно среди групп риска, а также к значительным экономическим потерям. Кроме того, вирусы гриппа, прежде всего животных (например, птиц – серотипов H5N1, H7N9), сохраняют высокий пандемический и эпизоотический потенциал.

Своевременная вакцинопрофилактика является наиболее эффективным, безопасным, а также экономически целесообразным, в первую очередь при массовом применении, способом борьбы с гриппом, а также подготовки к пандемии [Ю.З. Гендон, 2011; WHO, 2018]. В мировой практике для профилактики гриппа наиболее широко используются инактивированные вакцины, которые однако не лишены ряда ограничений.

Одним из наиболее перспективных подходов совершенствования вакцин для профилактики гриппа и других актуальных инфекционных заболеваний человека и животных является включение в их состав адъювантов (иммуоадъювантов) [Ю.З. Гендон 2011; Ю.М. Васильев, 2014]. Среди новых и перспективных направлений следует отметить биополимер на основе глюкозамина (ГА) – хитозан [Vasiliev Y., 2015].

Степень разработанности темы исследования. Системной проблемой [Vasiliev Y., 2015] в исследовании ИА хитозана является тот факт, что под термином «адъювант на основе хитозана» понимается не только обширная группа субстанций, отличающихся по физико-химическим характеристикам (ФХХ), в первую очередь молекулярной массе (ММ) и степени деацетилирования (СД), но и собственно адъюванты на их основе, в том числе в различном физическом

состоянии (гели, микрочастицы), а также всевозможные производные и комплексные соединения.

Данные научной литературы как правило описывают ИА препарата на основе хитозана без указания даже базовых ФХХ (ММ и СД), тем более методов их определения; то есть не представляется возможным ни воспроизвести описанные эксперименты, ни сопоставить результаты разных работ. Как следствие, до сих пор не решенным остается даже вопрос об ИА именно хитозана в составе адъювантов на его основе, тем более о связи ИА с ФХХ этого биополимера.

Цель и задачи исследования. *Цель исследования* – получение хитозана, его производных с различными ФХХ и сравнительное изучение их ИА при добавлении к инактивированным вакцинам против гриппа человека и животных. Для достижения этой цели были поставлены следующие *задачи*:

1. Получить субстанции хитозана и его производных, а также определить их ФХХ;
2. Изучить иммуногенность адъювантов на основе охарактеризованных субстанций хитозана и его производных с различными ФХХ на модели инактивированных вакцин против гриппа человека и животных;
3. Исследовать иммуногенность и защитный эффект перспективных адъювантов-кандидатов на основе охарактеризованных субстанций хитозана с различными ФХХ при добавлении к инактивированной вакцине против гриппа;
4. Провести сравнительное изучение иммуногенности препаратов-кандидатов на основе охарактеризованных субстанций хитозана с другими адъювантами в составе инактивированных вакцин против гриппа, а также оценить особенности механизмов ИА хитозана.

Научная новизна. Впервые подобраны оптимальные условия ферментативного способа получения низкомолекулярного (НМ) хитозана (ММ 10

кДа, СД 85%) с использованием ферментного препарата (ФП), продуцируемого *Myceliophthora fergusi*.

Впервые создан набор адъювантов на основе охарактеризованных субстанций хитозана и его производных с широким диапазоном основных ФХХ (ММ и СД) при высокой однородности (низкий индекс полидисперсности (ИП)) и чистоте (содержание белка и эндотоксинов).

Впервые изучена в сравнении ИА препаратов на основе охарактеризованных субстанций хитозана и его производных с различными ФХХ на модели инактивированных вакцин против гриппа при внутримышечной (в/м) иммунизации мышей. Наибольшей ИА как по иммуногенности, так и защитному эффекту обладали препараты на основе хитозана с высокой ММ и СД. При этом производные хитозана (сукциноил-хитозаны; СХ) вне зависимости от степени замещения (СЗ) практически не были иммуногенны. Впервые показано, что препараты на основе хитозана с высокой ММ и СД по ИА превосходят гидроксид алюминия и CpG и не уступают адъювантам следующего поколения как суспензия и эмульсия «масло в воде» на основе сквалена.

Впервые показано, что иммуногенность адъювантов на основе хитозана с высокой ММ и СД проявляется лишь при совместном введении с вакциной (антигеном).

Теоретическая и практическая значимость работы. Представлено научное обоснование целесообразности дальнейшего изучения ИА препаратов на основе охарактеризованных субстанций хитозана, прежде всего с высокой ММ и СД, при соблюдении требований высокой однородности и чистоты.

Разработанный адъювант-кандидат на основе хитозана (ММ 700 кДа, СД 85%), сможет найти применение при изготовлении вакцин против гриппа и других актуальных инфекционных агентов человека и животных, а также стать основой

для разработки лекарственных препаратов нового поколения для медицинского и ветеринарного применения.

Предложены условия объективного сравнения ИА препаратов на основе хитозана – создание набора охарактеризованных субстанций, различающихся по одной из ключевых ФХХ (ММ и СД) при высокой однородности (низкий ИП) и чистоте, что целесообразно использовать в исследованиях различных биопрепаратов, в том числе иммунобиопрепаратов, нового поколения.

Ферментативный способ получения субстанций хитозана с заданными характеристиками (ММ и СД при низком ИП и содержанием примесей) открывает широкие возможности для разработки хитозана для биомедицинского применения.

Методология и методы исследования. В работе использовался ряд классических и современных биохимических, вирусологических и иммунологических методов (см. раздел «Материалы и методы»).

Положения, выносимые на защиту:

1. Способ гидролиза с использованием ферментного препарата (ФП), продуцируемого *Myceliophthora fergussi*, при экспериментально подобранных оптимальных условиях (фермент-субстратное соотношение 1:800; рН 5,5; температура 55 °С, продолжительность 2 ч) позволяет получить субстанцию хитозана с молекулярной массой (ММ) 10 кДа и степенью деацетилирования (СД) 85%, при высокой однородности (индекс полидисперсности (ИП) 2,1) и чистоте (0,15% остаточного белка, 67 ЕЭ/мл эндотоксинов);
2. Создан набор охарактеризованных субстанций хитозана с физико-химическими характеристиками (ФХХ) в широком диапазоне (ММ 10-700 кДа, СД 30-98% при низком ИП), а также его производных – сукциноил-хитозаны (СХ) с различной степенью замещения (СЗ), от 25 до 75%. Субстанции хитозана охарактеризованы с использованием различных методов (вискозиметрии, ВЭЖХ,

ЯМР, УФ-спектроскопии и кондуктометрии), а также по содержанию примесей (эндотоксином (LAL-тест) и остаточному белку (аминокислотный анализ)). На основе данных субстанций в контролируемых условиях изготовлены соответствующие адьюванты в форме 1,0% растворов в глутаминовой кислоте (рН 5,01);

3. Прямое сравнительное изучение иммуноадьювантной активности (ИА) препаратов на основе охарактеризованных субстанций хитозана и его производных на модели экспериментальных инактивированных вакцин против гриппа человека и животных при внутримышечном (в/м) введении мышам показало, что адьюванты на основе хитозана с различными ФХХ неодинаково повышают иммуногенность и защитный эффект вакцин. Наиболее иммуногенными оказались хитозаны с высокой ММ и СД;

4. Разработан перспективный адьювант-кандидат на основе охарактеризованной субстанции хитозана (ММ 700 кДа, СД 85%), который повышает иммуногенность вакцин против вирусов гриппа человека и животных, причем по титрам сывороточных антител в РЗГА – в 896, 56 и 13 раз в отношении гомологичных (вакцинных) вирусов A/California/07/2009 X-179A (H1N1), A/Vietnam/1194/2004 NIBRG-14 (H5N1) и A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), соответственно; индуцирует задерживающие гемагглютинацию (РЗГА), вирус-нейтрализующие (РН), а также вирус-специфические IgG в сыворотках и легких (ELISA); формирует перекрестную иммуногенность в отношении гетерологичного по нейраминидазе (NA) штамма A/mallard/Pennsylvania/1024/84 (H5N2); а также обеспечивает полный защитный эффект в отношении 100 ИД₅₀/0,05 мл уже после 1-кратной иммунизации вакциной на основе A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1);

4. Сравнительное изучение препаратов на основе охарактеризованных субстанций хитозана с высокими ММ и СД, а также его производных и других адьювантов, различных по природе и механизму действия, показало, что

иммуногенность хитозана не уступает таковой экспериментальных препаратов нового поколения: суспензии и эмульсии «масло в воде» на основе сквалена, а также значительно превышает таковую гидроксида алюминия и CpG; при этом производные хитозана (СХ с различной СЗ) практически не были иммуногенными;

5. Оценка особенностей механизмов ИА препаратов на основе охарактеризованных субстанций хитозана показала, что для повышения иммуногенности необходимо совместное введение адьюванта и вакцины (хитозана и антигена).

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты доложены и обсуждены на ведущих международных и российских научно-практических конференциях, в том числе: Международной конференции «ESWI influenza conference» (Рига, Латвия, 2014); Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015); Международной конференции молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии» (Казань, 2015); Международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Уфа, 2016).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 84 страницах машинописного текста, включая 13 таблиц и 16 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы исследования», 3 глав с результатами собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы (63 источника, среди которых 21 – отечественные).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходные *хитозаны* (ООО «Биопрогресс», Щелково, Московская обл.) имели следующие ФХХ (здесь и далее используется условное обозначение ММ-СД, определяемые как Мv и посредством ЯМР, соответственно): 1000-85 и 200-85.

Использованные в работе субстанции хитозана (см. Табл. 3) были получены из исходных методами ферментативного и кислотного гидролиза, а также реацетилирования (см. Рис. 1), за исключением хитозана 20-98, любезно предоставленного с.н.с. Центра Биоинженерии РАН, к.х.н. А.Н. Левовым. Очистку хитозанов (получение субстанций) проводили переосаждением. Для ферментативного гидролиза использовали ФП, содержащий комплекс высокоактивных карбогидраз, продуцируемый мицелиальным грибом *Myceliophthora fergusi* UV-64 ВКМ F-3932D (Всероссийская коллекция микроорганизмов при ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, Московская обл.). Реацетилирование проводили с использованием уксусного ангидрида в водно-спиртовой среде. Субстанции хитозана *характеризовали* следующим образом: по СД методом кондуктометрического титрования (КТ) и спектральными методами (ЯМР, УФ-спектроскопией), а также по ММ – методами капиллярной вискозиметрии (M_v) и ВЭЖХ (M_w и M_n , а также ИП).

Адьюванты на основе хитозана готовили как 1,0% растворы в глутаминовой кислоте, после растворения рН доводили до 5,01 с использованием 1 М гидроксида натрия. СХ растворяли в воде, рН доводили до 5,01 или 8,01. Стерилизацию проводили автоклавированием (121 °С, 15 мин). В качестве *адьювантов сравнения* использовали минеральное основание гидроксид алюминия, олигонуклеотид CpG (агонист TLR9), а также экспериментальные препараты следующего поколения [М.И. Черникова с соавт., 2015]: суспензию и эмульсию по типу «масло в воде» на основе сквалена (Табл. 1).

Использовали группы нелинейных *мышей* (белые, беспородные, самки, весом 14-16 г на момент первой иммунизации; ФГБУН «НЦБМТ», филиал «Андреевка», Московская обл.). В работе использовали *штаммы вируса гриппа* человека и животных, полученные из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва (Табл. 2).

Таблица 1 – Адьюванты сравнения

условное обозначение	полное название	источник	доза
МЭ	эмульсия по типу «масло в воде» на основе сквалена	экспериментальные препараты	1:1 по объему с вакциной
МС	суспензия		1:1 по объему с вакциной
Al(OH)₃	гидроксид алюминия	Brenntag Biosector, Дания	100 мкг на мышь на иммунизацию
СрG	олигонуклеотид СрG	Синтол, Москва	10 мкг на мышь на иммунизацию

Вирусы нарабатывали в куриных эмбрионах (КЭ). После пассажа, охлаждения и поэтапного центрифугирования и ультрацентрифугирования проводили ресуспендирование в ФСР. После накопления вирусные препараты контролировали на стерильность, а также биологическую активность. Экспериментальные моновалентные инактивированные цельновирионные вакцины готовили следующим образом: инактивацию проводили 0,05% формальдегидом (2 ч при 36 °С). Удаление инактивирующего агента проводили ультрацентрифугированием. Вакцины проверяли на полноту инактивации (в КЭ), а также стерильность.

Таблица 2 – Вирусы

условное обозначение	вирус
SOIV	A/California/07/2009 X-179A (H1N1)
H1N1	A/Brisbane/59/2007 IVR-148 (H1N1)
H5N1	A/Vietnam/1194/2004 NIBRG-14 (H5N1)
H5N2	A/mallard/Pennsylvania/1024/84 (H5N2)
PR8	A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)

Адьюванты на основе хитозана добавляли к вакцинам в соотношении по объему 1:1 (конечная концентрация всех адьювантов на основе хитозана и его производного – 0,5%). В качестве контроля использовали вакцину без адьюванта (вместо него добавляли ФСР), а также группу неиммунизированных мышей той же партии.

Мышей (по 10 в каждой группе) *иммунизировали* в/м в заднюю конечность в объеме 0,2 мл 1- и 2-кратно, с интервалом 14 дней. Эвтаназию (эфир) и забор биоматериала (кровь, легкие) проводили через 14 дней после 1- или 2-кратной иммунизации. ИА определяли через *иммуногенность и защитный эффект*. Для оценки иммуногенности использовали реакцию задержки гемагглютинации (РЗГА), нейтрализации (РН), а также иммуноферментный анализ (ELISA) на вирус-специфические IgG. Сыворотки для РЗГА очищали центрифугированием (1000 g, 10 мин), обрабатывали нейраминидазой холерного вибриона (Denka Seiken, Япония), далее разводили в ФСР до 1:10 и прогревали на водяной бане при 56 °С в течение 30 мин. Для РН сыворотки после очистки сразу разводили в ФСР до 1:10 и прогревали. Экстракты легких обрабатывали аналогичным образом. РЗГА ставили с использованием суспензии эритроцитов кур против очищенного и концентрированного вирусного препарата той же партии, что и для изготовления вакцины. Реакцию ставили в 4 повторах при рабочей дозе вируса 8 ГАЕ/0,05 мл, РН (MDCK) – аналогичным образом при рабочей дозе вируса 100 ЦПД₅₀/0,1 мл. Минимальный определяемый титр для РЗГА и РН составил 1:5. Постановку ELISA осуществляли на 96-луночных полистироловых планшетах высокой сорбции (Corning, США), использовали конъюгат анти-мышь-IgG с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Германия). Оптическую плотность (ОП) считывали при 450-620 нм на многоканальном спектрофотометре Varioskan (Thermo Scientific, США). Результаты анализа представляли как соотношение значений средней оптической плотности в эксперименте (ОПэ) к средней оптической плотности в контрольной группе неиммунизированных животных (ОПк). Защитный эффект вакцин оценивали по выделению вируса из легких иммунизированных животных после заражения диким вариантом PR8. На 14 день после иммунизации животных под частичным эфирным наркозом инфицировали интраназально 1, 100 и 10 000 ИД₅₀/0,05 мл. Через 72 ч после инфекции проводили эвтаназию (эфир) и с

помощью КЭ из легких выделяли вирус (минимальный определяемый титр составил ЭИД₅₀/0,1 мл).

Все биологические реакции титрования ставили не менее чем в 4 повторах, результаты представлены как средние титры по всем повторам. Статистическую обработку данных проводили с использованием SPSS Statistics (IBM, США). Доверительный интервал составил 95%. Разницы титров в 2 и более раза были существенные.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение и характеристика субстанций хитозана

Схема получения субстанций хитозана представлена на Рис. 1. Проведенные исследования позволили выбрать следующие условия ферментативного гидролиза (выход 50%): pH 5,6; температура 55 °С; соотношение фермент-субстрат – 1:800 и продолжительность – 2 ч.

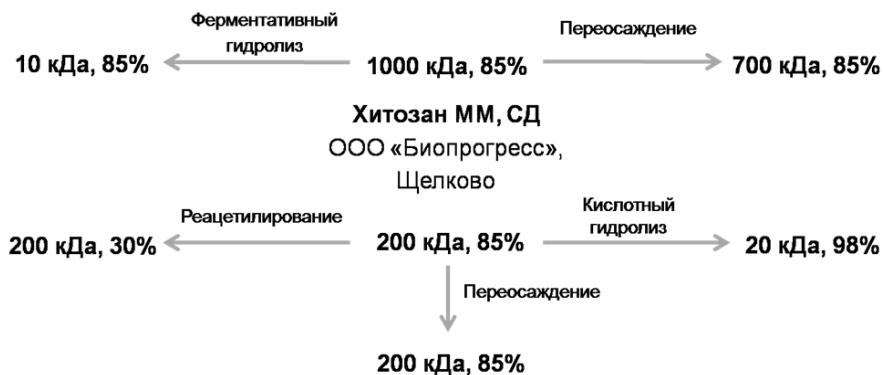


Рисунок 1 – Схема получения субстанций хитозана

В ходе работы был сформирован набор охарактеризованных субстанций хитозана: ММ и СД (Табл. 3); причем остаточный белок и бактериальные эндотоксины не превышали 0,19% и 175 ЕЭ/мл, соответственно, для всех субстанций. На основе данных хитозанов были приготовлены соответствующие адьюванты для вакцин.

Таблица 3 – ФХХ субстанций хитозана

хитозан (ММ-СД)	ММ, кДа			ИП	СД, %		
	Mv	Mw	Mn		ЯМР	КТ	УФ
I. субстанции Института биоинженерии (ФИЦ Биотехнологии РАН)							
200-85	200	235	102	2,3	96	84	96
700-85	700	540	260	2,05	85	84	83
10-85	10	18	9	2,1	85	85	90
20-98	20	11	6	1,86	98	99	100
II. производные хитозана							
200-30	880	720	230	3,13	30	28	30
CX50	сукциноил-хитозан со степенью замещения 50%						
III. субстанции Sigma-Aldrich (Германия)							
300-85	300	670	260	2,5	82	81	78
250-85	250	390	200	1,96	85	71	74

IIА препаратов на основе хитозана в составе вакцин против гриппа

Иммуногенность адъювантов на основе хитозана в составе вакцин H5N1

Адъюванты на основе охарактеризованных субстанций хитозана с высокой ММ и СД оказались наиболее иммуногенными для инактивированных вакцин против гриппа птиц H5N1, причем не только в отношении вакцинного (Рис. 2), но также и гетерологичного штамма (Рис. 3). Наибольшая иммуногенность отмечалась для хитозана 700-85.

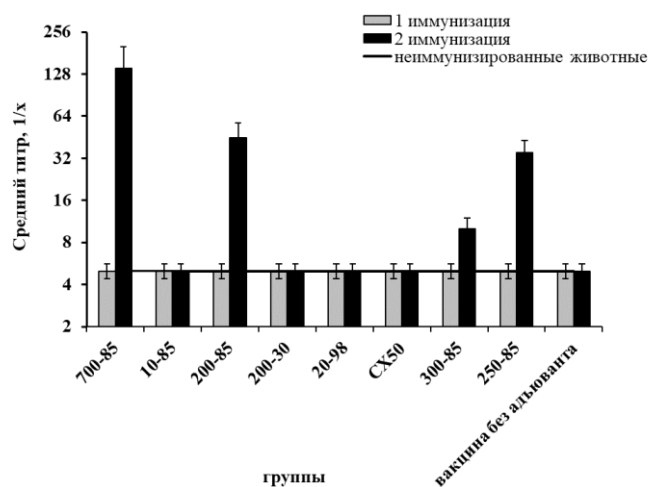


Рисунок 2 – Иммуногенность (РЗГА, сыворотки) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины H5N1 в отношении вакцинного штамма

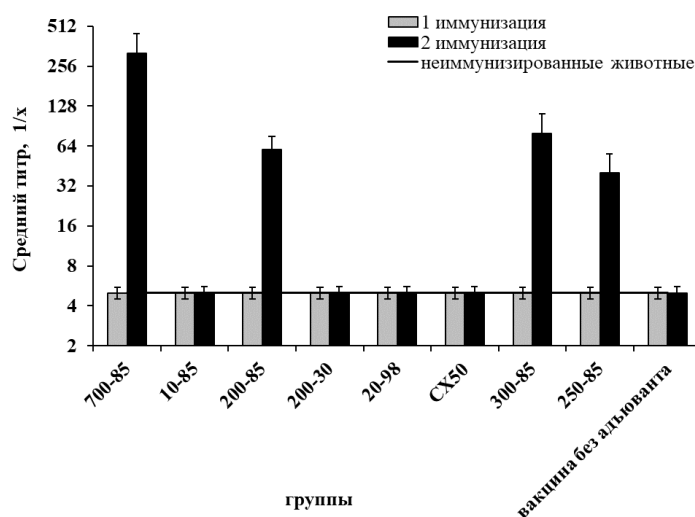


Рисунок 3 – Иммуногенность (РЗГА, сыворотки) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины H5N1 в отношении гетерологичного штамма H5N2

Иммуногенность адьювантов на основе хитозана в составе вакцин SOIV

Хитозаны с различными ММ и СД неодинаково повышают иммуногенность вакцины против гриппа. В целом, иммуногенность хитозанов с высокой ММ и СД проявлялась уже после 1-кратной иммунизации (РЗГА и РН). Так, титры антител (РЗГА, Рис. 4) повышались в сравнении с вакциной без адьюванта в 26, 32, 48 и 56

раз для хитозанов 700-85, 200-85, 300-85 и 250-85, соответственно. Более того, хитозан 700-85 после 2-кратной иммунизации повышал титр в 896 раз.

В то же время ни одна комбинация адъюванта и вакцины не повышала иммуногенность в отношении антигенно отличного штамма (РЗГА и РН), при этом титры антител в пределах чувствительности метода не определялись.

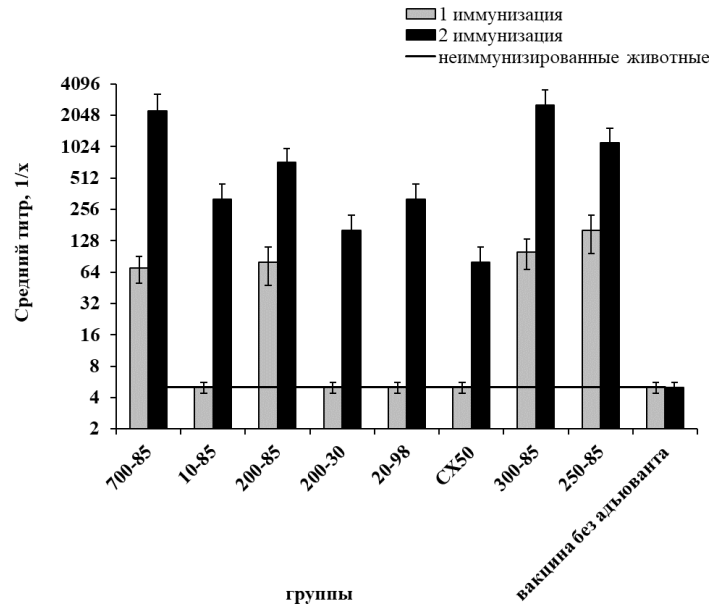


Рисунок 4 – Иммуногенность (РЗГА, сыворотки) адъювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины SOIV в отношении вакцинного штамма

Иммуногенность и защитный эффект адъювантов-кандидатов на основе хитозана в составе вакцин PR8

Совокупность полученных данных показывает, что хитозаны с высокой ММ и СД, в особенности 700-85 обладают высокой иммуногенностью и защитным эффектом при добавлении к инактивированной вакцине против вируса гриппа человека, который реализуется через индукцию главным образом антител в сыворотке (РЗГА, РН, IgG (Рис. 5)) и, в определенной степени, в легких (IgG).

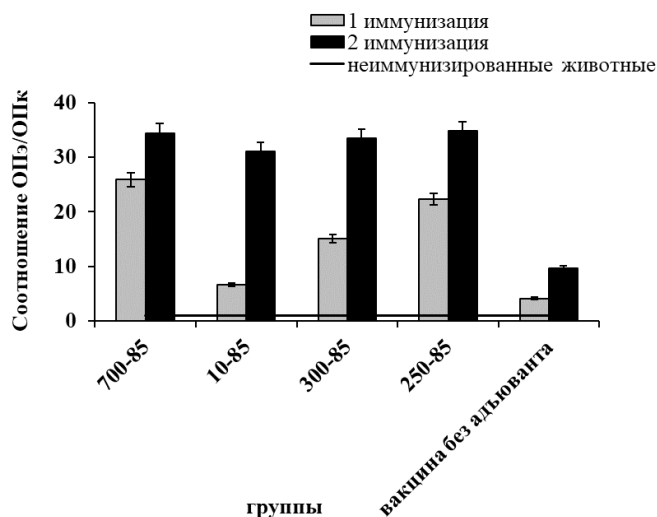


Рисунок 5 – Иммуногенность (IgG, сыворотки) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины PR8 в отношении вакцинного штамма

Более того, хитозаны с высокой ММ уже после 1-кратной иммунизации обеспечивают полный защитный эффект (вирус в пределах чувствительности метода не выделяется из легких вакцинированных мышей после инфекции) в отношении дозы 100 ИД₅₀/0,05 мл (Рис. 6). После 2-кратной иммунизации все изученные хитозаны с высокой ММ индуцировали полный защитный эффект в отношении максимальной использованной дозы (10 000 ИД₅₀/0,05 мл), а хитозан 10-85 – лишь до дозы 100 ИД₅₀/0,05 мл.

Сравнительное изучение иммуногенности адьювантов на основе хитозана и особенности механизмов ИА

Результаты сравнительных исследований по РЗГА с сыворотками против вакцинного штамма (Рис. 7) показали, что хитозан как после 1-кратной, так и после 2-кратной иммунизации не уступает МЭ и МС, а также существенно опережает по иммуногенности гидроксид алюминия и СрG.

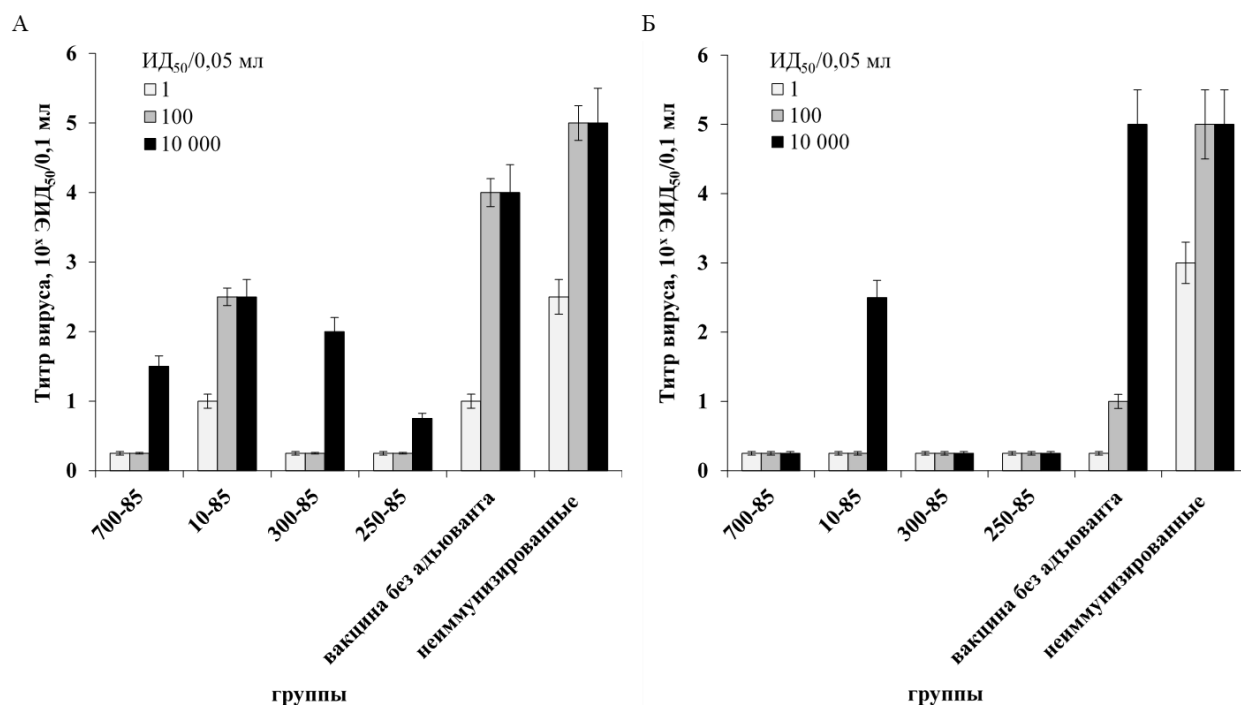


Рисунок 6 – Защитный эффект (дикий вариант PR8) адъювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины PR8 после 1- (А) и 2-кратной (Б) иммунизации

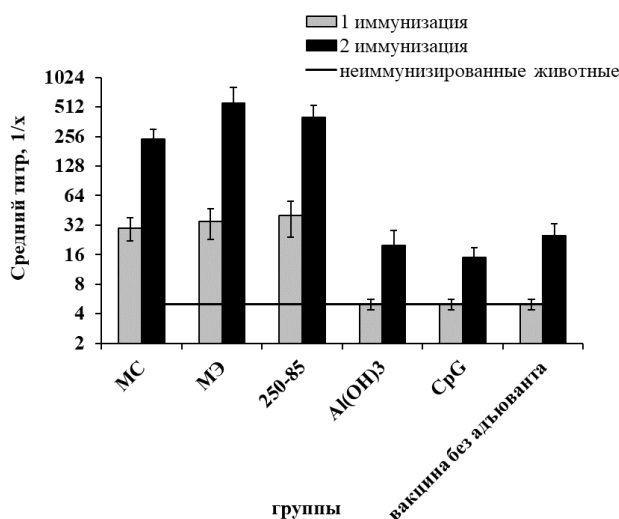


Рисунок 7 – Иммуногенность (РЗГА, сыворотки) препарата на основе хитозана в сравнении с другими адъювантами на модели инактивированной вакцины SOIV против вакцинного штамма

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность полученных данных показала, что адъюванты на основе охарактеризованных субстанций хитозана и его производных с различными ФХХ (с низким ИП и содержанием белка и эндотоксинов) неодинаково повышают

иммуногенность вводимых мышам в/м инактивированных вакцин против гриппа человека и животных. ИА определяется взаимодействием таких факторов как ФХХ хитозана (прежде всего ММ, а также СД) и вакцинный штамм (антиген). В целом, хитозаны с большей ММ и СД, но не производные хитозана (СХ с различной СЗ) обладали большей иммуногенностью и защитным эффектом. При этом хитозаны с высокой ММ и СД по иммуногенности опережали такие адьюванты как гидроксид алюминия и СpG и не уступали по этому показателю экспериментальным суспензии и эмульсии «масло в воде» на основе сквалена. Кроме того, для реализации ИА хитозана необходимо введение адьюванта совместно с антигеном («в одном шприце»).

Наиболее перспективным адьювантом-кандидатом оказался препарат на основе хитозана с ММ 700 кДа, СД 85%.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны оптимальные условия (фермент-субстратное соотношение 1:800; рН 5,5; температура 55 °С; продолжительность 2 ч) ферментативного способа получения субстанции хитозана с заданными физико-химическими характеристиками (ФХХ) (молекулярная масса (ММ) 10 кДа, степень деацетилирования (СД) 85%) при низком (2,1) индексе полидисперсности (ИП) и содержании примесей (0,15% белка, 67 ЕЭ/мл эндотоксинов).
2. Создан набор охарактеризованных субстанций хитозана с ФХХ в широком диапазоне (ММ 10-700 кДа, СД 30-98%) при высокой однородности и чистоте, а также производные – сукциноил-хитозаны (СХ) с различной (25-75%) степенью замещения (СЗ). На основании данных субстанций в контролируемых условиях изготовлены адьюванты для вакцин.
3. Показано, что иммуноадьювантная активность (ИА) препаратов (в форме 1,0% растворов в глутаминовой кислоте при рН 5,01) на основе хитозана с различными ФХХ при добавлении к экспериментальным инактивированным

вакцинам против гриппа человека и животных (при внутримышечном (в/м) введении мышам) – неодинаковая. Иммуногенность определяется комплексным взаимодействием 3 ключевых факторов: ФХХ хитозана (прежде всего, ММ, но также и СД) и вакцинным штаммом. При этом наибольшая иммуногенность и защитный эффект отмечались для хитозанов с высокой ММ и СД, а СХ с различной СЗ практически не обладали ИА.

4. Продемонстрировано, что препараты на основе охарактеризованных субстанций хитозана с высокой ММ и СД не только не уступают по иммуногенности таким экспериментальным адьювантам как суспензия и эмульсия по типу «масло в воде» на основе сквалена, но и превышают таковую гидроксида алюминия и СpG.
5. Доказано, что ИА препаратов на основе охарактеризованных субстанций хитозана реализуется лишь при совместном введении адьюванта с вакциной (антигеном), то есть «в одном шприце».
6. Разработан перспективный адьювант-кандидат на основе хитозана (ММ 700 кДа, СД 85%), который: повышает иммуногенность инактивированной вакцины против гриппа практически в 1000 раз; формирует перекрестный иммунный ответ (в отношении гетерологичного по NA штамма гриппа птиц); индуцирует задерживающие гемагглютинацию, вирус-нейтрализующие, а также вирус-специфические IgG в сыворотках и легких; полностью защищает животных от инфекции (стерильный иммунитет) уже после 1-кратной иммунизации до дозы 100 ИД₅₀/0,05 мл.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Адьювант-кандидат на основе субстанции хитозана с ММ 700 кДа и СД 85% перспективен для дальнейшей разработки в рамках доклинических исследований, глубокого изучения механизмов ИА (характеристика профиля иммунного ответа

(иммунофенотипа)), оценки «доза-эффект», а также изучения ИА в составе вакцин против других актуальных инфекционных агентов человека и животных.

Представляет интерес использование данного хитозана как платформы для создания панели иммунобиопрепаратов с управляемыми свойствами, в том числе для адаптации под конкретный антиген, тип вакцины, способ доставки и особенности иммунного ответа. Кроме того, противомикробные свойства данного биополимера позволяют таким препаратам выступать не только как адъюванты, но и консерванты, а с учетом возможных взаимодействий с белками – и стабилизаторами вакцин.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК

1. *Хасанова Л.М., Ильина А.В., Варламов В.П., Сеницына О.А., Сеницын А.П. Деполимеризация хитозана с использованием ферментного комплекса, продуцируемого *Myceliophthora sp.* // **Прикладная биохимия и микробиология.** – 2014. – № 4. – С. 422-428.
2. Хантимирова Л.М., Каширина О.С., Черникова М.И., Васильев Ю.М. Сравнительная оценка иммуногенности охарактеризованных препаратов на основе хитозана и других адъювантов в составе инактивированных вакцин против гриппа // **Эпидемиология и вакцинопрофилактика.** – 2016. – № 1. – С. 86-92.
3. Хантимирова Л.М., Каширина О.С., Черникова М.И., Васильев Ю.М. Адъювантный эффект препаратов на основе хитозана в составе инактивированной вакцины против гриппа человека // **Известия Уфимского научного центра РАН.** – 2016. – № 3. – С. 170-172.
4. Лисюкова Ю.В., Сироткин А.С., Хантимирова Л.М. Анализ процесса гидролиза хитозана с использованием ферментного препарата грибного происхождения, продуцируемого *Myceliophthora fergusi* // **Вестник технологического университета.** – 2016. – № 10. – С. 147-148.

Публикации в других изданиях

5. ***Хасанова Л.М.**, Ильина А.В., Варламов В.П., Сеницын А.П. Мультиферментный комплекс мицелиального гриба *Muceliophthora sp.* для получения низкомолекулярного хитозана // Материалы VI российского симпозиума «Белки и пептиды», Уфа. – 2013. – С. 199.
6. ***Хасанова Л.М.**, Каширина О.С., Черникова М.И., Ильина А.В., Васильев Ю.М. Изучение иммуoadъювантной активности препаратов на основе хитозана на модели инактивированной вакцины против вируса гриппа // Тезисы научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва. – 2014. – С. 150.
7. ***Хасанова Л.М.**, Ильина А.В., Варламов В.П., Сеницына О.А., Сеницын А.П. Исследование ферментного комплекса, продуцируемого мицелиальным грибом рода *Muceliophthora* // Сборник научных трудов «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов», Москва. – 2014. – С. 84-92.
8. ***Хасанова Л.М.** Физико-химические характеристики и иммуногенность препаратов на основе хитозана в составе инактивированной вакцины против вируса гриппа // Конференция ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва. – 2014.
9. ***Хасанова Л.М.**, Ильина А.В., Васильев Ю.М., Варламов В.П. Влияние условий приготовления и стерилизации растворов адъювантов на основе хитозана на иммуногенность вакцины против гриппа // Материалы конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана», Пермь. – 2014. – С. 329-334.
10. Vasiliev Y.M., Kashirina O.S., Chernikova M.I., ***Khasanova L.M.** Chitosan-based adjuvants for inactivated influenza vaccines: characteristics determine immunogenicity and protective efficacy in a preclinical setting // International influenza meeting, Muenster, Germany. – 2014. – P107.
11. Chernikova M.I., Kashirina O.S., ***Khasanova L.M.**, Vasiliev Y.M. A comparative study of adjuvants with different mechanisms of action for influenza vaccines in mice // ESWI influenza conference, Riga, Latvia. – 2014. – SPA5P03.
12. ***Khasanova L.M.**, Kashirina O.S., Chernikova M.I., Vasiliev Y.M. Characteristics of chitosan-based adjuvants determine immunogenicity of inactivated influenza vaccines in mice // ESWI influenza conference, Riga, Latvia. – 2014. – SPA5P02.
13. Vasiliev Y.M., Kashirina O.S., Chernikova M.I., ***Khasanova L.M.**, Kalmykova L.A. Adjuvants for inactivated poliomyelitis vaccines: preclinical comparative studies // 8th Vaccine & ISV congress, Philadelphia, USA. – 2014. – P1.01.

14. *Хасанова Л.М. Адьювантные свойства хитозана в составе вакцин против гриппа человека и животных // Шорыгинские чтения, Щелково, Московская область. – 2015. – № 8.
15. *Хасанова Л.М., Каширина О.С., Черникова М.И., Ильина А.В., Варламов В.П., Васильев Ю.М. Иммунобиоадьюванты на основе хитозана для вакцин против гриппа нового поколения // Материалы конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва. – 2015. – Ч. 1. – С. 151-152.
16. *Хасанова Л.М. Влияние физико-химических характеристик хитозана на иммуногенность и защитный эффект инактивированных вакцин против гриппа // Тезисы докладов конференции, посвященной 170-летию И.И. Мечникова, Москва. – 2015. – С. 48-49.
17. *Хасанова Л.М., Каширина О.С., Черникова М.И., Ильина А.В., Варламов В.П., Васильев Ю.М. Хитозан в качестве адьюванта в составе иммунобиопрепаратов для профилактики гриппа // Материалы конференции «Пищевые технологии и биотехнологии», Казань. – 2015. – С. 85.
18. *Хасанова Л.М., Ильина А.В., Варламов В.П. Перспективы применения ферментных препаратов-гидролаз для получения низкомолекулярного хитозана // Тезисы конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва. – 2015. – С.164-165.
19. Хантимирова Л.М. Иммуногенность и защитный эффект адьювантов на основе хитозана в составе инактивированных вакцин против гриппа. Шорыгинские чтения, Щелково, Московская область. – 2016. – № 3.
20. Лисюкова Ю.В., Сироткин А.С., Хантимирова Л.М. Оценка процесса гидролиза хитозана с использованием ферментного препарата грибного происхождения // Конференция «Пищевые технологии и биотехнологии», Казань. – 2016. – С. 191-193.

Патенты

1. Варламов В.П., Дрозд Н.Н., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Логвинова Ю.С., Хантимирова Л.М. Антиагрегантное средство // **Патент** на изобретение РФ №2647366 от 12.04.2017.
2. Хантимирова Л.М., Васильев Ю.М., Каширина О.С., Черникова М.С., Калошин А.А., Михайлова Н.А., Ильина А.В., Лопатин С.А., Варламов В.П. Иммуноадьювантная композиция для вакцин против инфекционных агентов вирусной и бактериальной природы // **Заявка** на изобретение №2018120910 от 06.06.2018.

*** Л.М. Хасанова = Л.М. Хантимирова**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Условные обозначения адъювантов приведены в Табл. 1.

Условные обозначения штаммов вируса гриппа приведены в Табл. 2.

Условные обозначения хитозанов приведены в Табл. 3.

в/м – внутримышечно;

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения;

ГА – 2-амино-2-дезоксид-D-глюкоза (глюкозамин);

ИА – иммуноадъювантная активность;

ИД – инфекционная доза;

ИП – индекс полидисперсности;

КТ – кондуктометрическое титрование;

КЭ – куриные эмбрионы;

ММ – молекулярная масса (если не указано иначе – средневязкостная, M_v);

ОП – оптическая плотность;

ОПк – ОП в контрольной группе неиммунизированных животных;

ОПэ – экспериментальная (опытная) ОП;

РЗГА – реакция задержки (торможения, ингибирования) гемагглютинации;

РН – реакция нейтрализации;

СД – степень деацетилирования (если не указано иначе – по ЯМР);

СЗ – степень замещения;

СХ – сукционил-хитозан;

ФП – ферментный препарат;

ФСР – фосфатно-солевой раствор;

ФХХ – физико-химические характеристики;

ЦПД – цитопатогенное действие;

ЭИД – эмбриональная инфекционная доза;

ЯМР – ядерный (протонный) магнитный резонанс;

НА – нейраминидаза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность научным руководителям за практическую и консультативную помощь в проведении и планировании экспериментов, а также всестороннюю поддержку работы: к.б.н., и.о. директора ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России Ю.М. Васильеву; к.х.н., ведущему научному сотруднику лаборатории Инженерии биополимеров ФИЦ Биотехнологии РАН А.В. Ильиной.

Автор выражает глубокую признательность д.х.н., профессору, заведующему лабораторией Инженерии биополимеров ФИЦ Биотехнологии РАН В.П. Варламову за предоставление возможности провести диссертационные исследования.

Автор выражает искреннюю благодарность за помощь в выполнении отдельных этапов работы: к.х.н., старшему научному сотруднику лаборатории Инженерии биополимеров ФИЦ Биотехнологии РАН С.А. Лопатину за проведение анализа молекулярно-массовых характеристик хитозана методом ВЭЖХ; научным сотрудникам ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова О.С. Кашириной и М.И. Черниковой за помощь в работе с вирусами и вирусными препаратами, животными, оценке иммуногенности и защитного эффекта; руководителю УПЖ МПБП АО «НПО «Микроген» С.В. Денисенко за помощь в работе с животными.