

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Институт биоинженерии

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

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)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

кандидат биологических наук

Васильев Юрий Михайлович

кандидат химических наук

Ильина Алла Викторовна

Москва – 2019 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ОГЛАВЛЕНИЕ | 2 |
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| Актуальность темы исследования | 5 |
| Степень разработанности темы исследования..... | 6 |
| Цель и задачи исследования | 7 |
| Научная новизна..... | 7 |
| Теоретическая и практическая значимость работы..... | 8 |
| Методология и методы исследования..... | 9 |
| Положения, выносимые на защиту | 9 |
| Степень достоверности и апробация результатов | 11 |
| Публикации | 12 |
| Объем и структура диссертации..... | 12 |
| ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ..... | 13 |
| 1. Профилактика гриппа с помощью вакцин..... | 13 |
| 2. Адьюванты для вакцин..... | 14 |
| 3. Адьюванты на основе хитозана | 15 |
| 3.1. Получение хитозана и его производных | 17 |
| 3.2. Адьювантная активность препаратов хитозана и его производных .. | 20 |
| МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 25 |
| 1. Общая информация..... | 25 |

| | | |
|------|--|----|
| 2. | Хитозан..... | 25 |
| 3. | ФХХ хитозана | 27 |
| 3.1. | Метод кондуктометрического титрования | 27 |
| 3.2. | Метод ядерного магнитного резонанса | 28 |
| 3.3. | Метод УФ спектроскопии | 29 |
| 3.4. | Метод капиллярной вискозиметрии | 30 |
| 3.5. | Высокоэффективная жидкостная хроматография | 31 |
| 4. | Аминокислотный анализ и LAL-тест..... | 31 |
| 5. | Адьюванты | 32 |
| 6. | Животные и культуры клеток | 33 |
| 7. | Вирусы и вакцины..... | 33 |
| 8. | Иммуoadьювантная активность | 35 |
| 9. | Статистическая обработка результатов исследований | 37 |
| | РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ | 38 |
| | Глава 1. Получение и характеристика субстанций хитозана | 38 |
| | Глава 2. ИА препаратов на основе хитозана в составе вакцин против гриппа | 42 |
| | 2.1. Иммуногенность адьювантов на основе хитозана в составе вакцин H5N1..... | 42 |
| | 2.2. Иммуногенность адьювантов на основе хитозана в составе вакцин SOIV | 46 |
| | 2.3. Иммуногенность и защитный эффект адьювантов-кандидатов на основе хитозана в составе вакцин PR8..... | 49 |
| | Глава 3. Сравнительное изучение иммуногенности адьювантов на основе хитозана и особенности механизмов ИА | 57 |

| | |
|--|----|
| ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ | 62 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 70 |
| ВЫВОДЫ..... | 71 |
| ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ | 73 |
| БЛАГОДАРНОСТИ | 74 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ | 75 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 77 |

ВВЕДЕНИЕ

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 [59]. Сезонные эпидемии гриппа приводят к большому количеству госпитализаций и летальных исходов, особенно среди групп риска (маленькие дети, беременные, пожилые люди и лица с хроническими заболеваниями), а также к значительным экономическим потерям [13, 61]. Кроме того, вирусы гриппа, прежде всего животных (например, птиц – серотипов H5N1, H7N9), сохраняют высокий пандемический и эпизоотический потенциал [60].

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 [8, 59].

В мировой практике для профилактики гриппа наиболее широко используются инактивированные вакцины, которые однако не лишены ряда ограничений [3, 7, 8, 59, 61]. Прежде всего, это недостаточная эффективность при иммунизации людей из групп риска, а также низкая перекрестная иммуногенность.

Одним из наиболее перспективных подходов совершенствования вакцин для профилактики гриппа и других актуальных инфекционных заболеваний человека и животных является включение в их состав адъювантов (иммуноадъювантов) [2, 3, 20]. Идеальный адъювант позволит повысить

эффективность и перекрестную иммуногенность вакцины, а также упростить схему иммунизации (сократить число вакцинаций). Более того, появляется возможность снизить дозу антигена при сохранении эффективности, то есть при той же мощности производства – изготовить больше доз вакцины, что особенно важно для подготовки к пандемии.

В настоящее время изучаются различные адъюванты на основе минеральных солей и оснований (например, алюминия), эмульсий «масло в воде», препараты прямого иммуномодулирующего действия, а также различные их комбинации [2, 3, 20]. Среди новых и перспективных направлений следует отметить биополимер на основе глюкозамина (ГА) – хитозан [52].

Таким образом, изучение иммуноадъювантной активности (ИА) препаратов на основе хитозана на модели вакцин против гриппа представляет несомненный интерес.

Степень разработанности темы исследования

Системной проблемой [52] 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 [52]. 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 СpG 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 fergusi*, при экспериментально подобранных оптимальных условиях (фермент-субстратное (Ф/С) 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 (эндотоксинам (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 адъювантов, 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 адъюванта 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).

Публикации

По материалам диссертации подготовлено и опубликовано 20 печатных работ, в том числе 4 – в изданиях, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных работ на соискание ученой степени кандидата наук (3 из них – первый автор).

Получен 1 патент, подана 1 заявка на патент Российской Федерации.

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).

ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Профилактика гриппа с помощью вакцин

Грипп остается одной из наиболее актуальных проблем современного здравоохранения. Так, по мнению экспертов ВОЗ ежегодно гриппом переболевают до 10% взрослого населения и до 30% детей [59]. Сезонные эпидемии гриппа приводят к большому количеству госпитализаций и летальных исходов, особенно среди групп риска (маленькие дети, беременные, пожилые люди и лица с хроническими заболеваниями) [13, 57-59, 61]. По данным ВОЗ только в развитых странах ежегодно от гриппа и его осложнений погибают до 650 тыс. человек.

Вирусы гриппа сохраняют высокий пандемический и эпизоотический потенциал [60], в особенности вирусы гриппа птиц (например, серотипы H5N1 и H7N9) и свиней и свиного происхождения (например, серотипы H1N1 и H3N2), – новый штамм может появиться в любое время и в любом месте.

Основной подход борьбы с гриппом – своевременная профилактика с использованием вакцин [59]. В настоящее время наиболее распространены инактивированные вакцины, вводимые в/м; которые однако не лишены ряда ограничений [3, 7, 8, 61]. Так, недостаточна эффективность в группах риска и перекрестный иммунный ответ относительно антигенно отличных от вакцинных штаммов. Кроме того, мощности всех производителей вакцин в мире недостаточно [42].

Следует отметить, что для решения проблемы соответствия циркулирующих вирусов и вакцинных штаммов (как следствие изменчивости гриппа [11, 43]) – эксперты ВОЗ 2 раза в год (1 раз для северного [57] и южного

[58] полушарий) формируют рекомендации по штаммовому составу сезонных вакцин.

Направления совершенствования вакцин против гриппа [3, 8, 61] включают разработку новых инактивированных, а также живых аттенуированных вакцин [12]. Кроме того, рассматриваются культуральные, рекомбинантные и другие технологии для наработки антигена.

Одно из перспективных направлений как совершенствования имеющихся, так и создания принципиально новых вакцин – использование адъювантов (иммуноадъювантов) [2, 20].

2. Адъюванты для вакцин

Идеальный адъювант [2, 20] позволяет не только повысить эффективность вакцины в группах риска и индуцировать широко перекрестный иммунный ответ, но также упростить схему иммунизации (вплоть до 1-кратной) и снизить дозу антигена (для вакцин против гриппа – гемагглютинина (НА)), в обоих случаях при сохранении иммуногенности. Последние 2 позиции особенно важны, поскольку позволяют при той же мощности производить больше доз вакцины, то есть иммунизировать больше людей (актуально для подготовки и в случае пандемии), а также компенсировать стоимость адъюванта.

Что касается терминологии, то в настоящей работе под адъювантами понимаются именно иммуноадъюванты для вакцин – препараты, усиливающие иммунный ответ по отношению к антигену.

Известен широкий спектр адъювантов для вакцин [2, 20]: минеральные соли и основания (например, гидроксид алюминия), эмульсии по типу «масло в воде» (например, на основе сквалена), а также иммуномодуляторы прямого действия различной природы (синтетические, бактериальные). Примеры

некоторых адъювантов для вакцин против гриппа, находящихся на продвинутых этапах разработки (прошедших клинические исследования) или в составе разрешенных к применению вакцин представлены в Табл. 1 [51].

Таблица 1 – Адъюванты в составе зарегистрированных вакцин для профилактики гриппа

| адъювант | характеристика |
|---------------------------|---|
| гидроксид алюминия | минеральное основание ($Al(OH)_3$) |
| MF59 | эмульсия «масло в воде» на основе сквалена |
| AS03 | эмульсия «масло в воде» на основе сквалена и токоферола |
| LT | термолабильный токсин <i>E. coli</i> |

Тем не менее, имеющиеся адъюванты неоптимально сочетают эффективность, безопасность, а также экономическую целесообразность, особенно при массовом применении [20].

Таким образом, представляют несомненный интерес исследования и разработка принципиально новых адъювантов.

3. Адъюванты на основе хитозана

Одно из направлений создания адъювантов следующего поколения для вакцин против актуальных инфекционных агентов человека и животных – препараты на основе биополимера хитозана [52].

Хитозан (или деацетилированный хитин) представляет собой гетерополимер, состоящий из остатков 2-амино-2-дезоксид-глюкозы (ГА) и N-ацетил-2-дезоксид-глюкозы (АГА), связанных β (1-4) гликозидной связью (Рис.1, $m < n$) [16]. Хитин – второй по распространенности после целлюлозы биополимер, в свою очередь – линейный биополимер, состоящий из мономерных звеньев АГА, связанных β (1-4) гликозидной связью (Рис. 1, $m > n$).

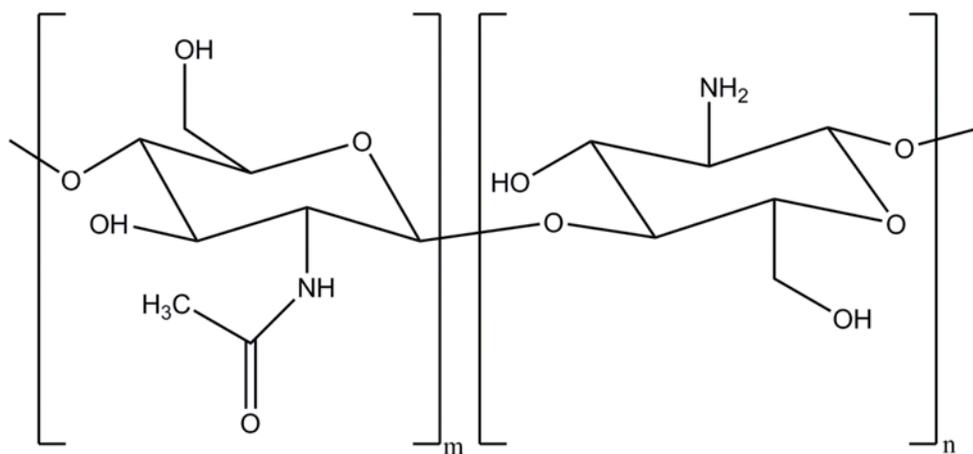


Рисунок 1 – Химическая структура хитозана (хитина)

Уникальное сочетание биосовместимости и биodeградируемости обуславливает безопасность применения как адьюванта. Кроме того, препараты на основе хитозана уже нашли широкое применение в различных отраслях народного хозяйства, в том числе биомедицине, пищевой промышленности, косметологии [1, 16, 25].

Хитозаны – огромная группа веществ, различающихся между собой, прежде всего, длиной цепи полимера и количеством деацетилированных групп. Для описания конкретного вещества используются, соответственно, ММ и СД – основные ФХХ хитозана [14]. Более того, каждая конкретная субстанция хитозана как биополимера представляет собой смесь веществ, что для ММ описывается ИП.

Определяют ФХХ хитозана рядом физико-химических методов, в частности, ВЭЖХ (также ИП) и вискозиметрией (для ММ); и кондуктометрией, УФ-спектрометрией и ЯМР (для СД) [14, 22].

3.1. Получение хитозана и его производных

Для получения хитозана [1] как основного производного хитина наиболее широко используют панцири ракообразных (раки, креветки, крабы). Источником хитина также являются экзоскелеты насекомых и клеточная стенка грибов. Хитин в исходном сырье представлен в виде хитин-глюканового (в клеточной стенке грибов), хитин-меланинового (в кутикуле насекомых) и хитин-белкового (в панцире ракообразных) комплексов.

Процесс производства хитозана в промышленных условиях [1] включает 2 принципиальных этапа.

Во-первых, осуществляют выделение хитина (депротеинизация щелочью, деминерализация кислотой и обесцвечивание полученного продукта щелочью). Процесс депротенизации позволяет снизить содержание белка с 25-50% до менее 1%. Минеральные соли (кальций, фосфаты, карбонаты) в составе хитин-содержащего сырья могут составлять 15-50%, в процессе деминерализации их содержание уменьшается до 0,2-3%.

Во-вторых, проводят деацетилирование хитина ферментативным или химическим способом. Химический способ деацетилирования основан на обработке хитина концентрированным раствором (50-60%) гидроксида натрия при высоких температурах (130-150 °С) в течение 1,5-2 ч. В таких условиях процесс деацетилирования протекает быстро, однако может также привести к изменению ФХХ (снижению ММ).

Следует отметить, что хитозан является катионным полисахаридом, растворимым при значениях рН ниже 5,0. Проблему растворимости хитозана в водных растворах (в частности, для биомедицинских исследований [25]) решают с использованием различных подходов: путем введения ионогенных групп, деполимеризации до НМ хитозанов [21] и олигосахаридов (хито-олигосахаридов), а также химической модификацией биополимера.

Получение НМ может проводиться различными способами: химическим [32] и ферментативным [40], а также физическим [5].

Химический метод деполимеризации хитозана с использованием неорганических кислот является самым простым и экономичным, однако используются жесткие условия проведения процесса (концентрированные кислоты и температуры 80-110 °С), что в свою очередь требует утилизации (нейтрализации) отходов, а основным продуктом гидролиза является ГА, выход которого составляет более 50%. Кроме того, в зависимости от выбора условий проведения гидролиза – концентрации кислоты, температуры и продолжительности, процесс может протекать по 2 направлениям: непосредственно расщепление гликозидных связей и отщепление N-ацетильных групп по длине цепи полимера – деацетилирование [17].

Наиболее широкое применение в химической деполимеризации хитозана нашла соляная кислота, причем расщепление гликозидной связи не происходит случайным образом внутри цепи, а осуществляется с невосстанавливающего конца цепи. Кроме того, используется азотистая кислота, однако в ходе реакции (при отсутствии этапа восстановления) может образовываться токсичный продукт – 5-гидроксиметилфурфурол. Иногда используется фосфорная кислота, однако необходимо обеспечить избыточное ее количество с последующим его удалением триэтиламино в этаноле [31].

Ферментативный метод деполимеризации [15, 40, 45] обладает рядом преимуществ: мягкие условия проведения самого процесса, отсутствие токсичных реактивов, сохранение структуры биополимера и даже возможность подобрать свойства конечного продукта в узком диапазоне. В то же время арсенал специфических ФП для промышленной биотехнологии весьма ограничен.

Обширную группу ферментов, катализирующих расщепление O-гликозидной связи, составляют гликозил-гидролазы (гликозидазы или карбогидразы; КФ 3.2.1). Ключевыми ферментами, вовлеченными в деградацию хитина и хитозана, являются хитиназа (эндо-1,4- β -поли-N-ацетил-глюкозаминидаза, КФ 3.2.1.14), N-ацетил- β -D-гексозаминидаза (КФ 3.2.1.52), хитозаназа (эндо-1,4- β -поли-глюкозаминидаза, КФ 3.2.1.132) и экзо-1,4- β -D-глюкозаминидаза (КФ 3.2.1.165).

В настоящее время основными биотехнологическими источниками хитиназ являются микроорганизмы различных видов: *Streptomyces*, *Vibrio*, *Serratia*, *Bacillus*. Так, бактериальные штаммы *Serratia marcescens* и *Streptomyces griseus* используются для коммерческого получения хитинолитических ферментов, препараты грибного происхождения получают из штаммов *Trichoderma harzianum*.

В последние годы активно исследуется применение неспецифических по отношению к хитину и хитозану ФП [33, 35, 44, 62]: карбогидразы (КФ 3.2.1.x) различного происхождения, протеиназы (КФ 3.4.x.x), а также липазы (КФ 3.1.1.x).

Таким образом, весьма перспективным способом получения хитозана с заданными свойствами с высокой однородностью и чистотой является ферментативный, что особенно важно для биомедицинских исследований. Кроме того, в случае ферментативного способа получения хитозана

принципиально важно становится определение специфических примесей – остаточного белка и эндотоксинов.

Одним из путей повышения растворимости хитозана, как отмечалось выше, является введение в молекулу биополимера ионогенных групп, например, карбоксильных. Так, одним из производных хитозана, растворимых в нейтральных условиях рН, является СХ, получаемый путем добавления в реакционную среду янтарного ангидрида. В зависимости от соотношения реактивов получают СХ с различной СЗ, причем СХ с СЗ 35-50% растворим при значениях рН ниже 4,5, а также рН 7,0; а при СЗ > 75% – только при значениях рН выше 7,0 [47].

3.2. Адьювантная активность препаратов хитозана и его производных

Первые сообщения о возможных иммунологических свойствах хитозана и его производных, а также хитина стали появляться еще в 80-ых гг. прошлого века [41]. Так, Nishimura К. с коллегами была показана такая активность хитозана (хитина) и некоторых, но не всех его производных (в зависимости от использованной модели). Однако детальный анализ публикации показывает, что недостаточно описаны методики приготовления препаратов, а также их характеристика. Как следствие, результаты работы невоспроизводимы и говорить об иммунологической, тем более ИА, не представляется возможным. Любопытно, что в работе используется препарат обозначенный как «деацетилованный на 70% хитин» (то есть хитозан с СД 70%).

К настоящему времени накоплено огромное множество публикаций, описывающих ИА хитозана и его производных в составе вакцин против гриппа, однако ключевые проблемы так и остались нерешенными. Как показал систематический обзор [52], до сих пор практически отсутствуют научные

статьи, где по крайней мере представлена базовая информация по адьювантам на основе хитозана (даже основные ФХХ (ММ и СД) с указанием метода оценки), что не позволяет объективно говорить даже об ИА препаратов на основе хитозана в целом. Необходимо подчеркнуть, что зачастую информация по ключевому компоненту вакцины наряду с антигеном ограничена фразами «хитозан», «хитозан средней ММ», «хитозан Sigma». Встречаются и такие работы, где используется «хитозан» с СД 20% (то есть хитин) [63].

Для решения проблемы необходимо как минимум указывать основные ФХХ (ММ с ИП, а также СД) с указанием метода, а также уровень чистоты с учетом способа получения (белок и обязательно эндотоксины [10]).

Говоря о необходимости объективной характеристики следует привести работу, в которой на модели рекомбинантных факторов роста показано, что СД использованного хитозана (изучались микрочастицы с ДНК) определяет эффективность экспрессии белка (высокая СД, низкая ММ) или индукции антител к нему (низкая СД, низкая ММ) [30], хотя остаются вопросы к подтверждению (сохранению) ФХХ хитозана в составе системы доставки. Также приведем в пример работу, где на модельном антигене (овальбумин) была сделана попытка оценить вклад ММ, СД, а также методики приготовления и размера частиц адьюванта на основе хитозана [48].

Данные некоторых работ в части характеристик хитозана и типа вакцины против гриппа обобщены в Табл. 2 [24, 27, 36, 63].

Крайне важно оценивать уровень эндотоксинов. Так, на модели остеогенеза стволовыми клетками было показано, что эндотоксины определяют ложно-положительный результат биологической активности хитозана, то есть не сам биополимер, а этот контаминант являлся действующим веществом [34]. Данная работа является одним из редких примеров работ в области биомедицины с адекватной характеристикой препаратов хитозана.

Таблица 2 – Адъюванты на основе хитозана (вакцины против гриппа)

| вакцина | штамм | способ введения | хитозан |
|---|---|------------------------|---|
| инактивированная цельновирионная эмбриональная и культуральная | A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) NIBRG-14 | в/м | 10 и 300 кДа (ММ), 85% (СД) |
| расщепленная | NIB16 (H1N1) | и/н | Protosan UP G213, 86% (СД) |
| ДНК (НА) | A/Swine/Guangdong/164/06 (H3N2) | в/м | 71,3 кДа (ММ), 20% (СД) |
| субъединичная | NIBRG-14 (H5N1) | и/н | хитозан (75-90% СД) или ТМХ (77,7% СД) |

Следует отметить, что практически отсутствуют научные данные по ИА базовых форм адъювантов на основе хитозана (растворы, гели), при этом активно, особенно на модели гриппа, изучаются всевозможные производные и комплексные препараты [52] (также см. Табл. 2). Так, в одной работе детально изучаются механизмы ИА микрочастиц производного хитозана, однако как

препарат сравнения исходный хитозан не включен [53]. Как следствие, говорить о связи «структура-функция» в части хитозана (а не просто микрочастиц), а также обоснованности практического применения сложной конструкции не представляется возможным.

Остановимся также на работе de Geus E. с коллегами [26], в которой не отмечается повышение иммуногенности для адъюванта на основе хитозана в составе вакцины против гриппа птиц. Поскольку характеристика препарата практически отсутствует, как и описание методики приготовления (указан лишь некий Protasan UP CL 213), не представляется возможным разобраться в объективных первопричинах отсутствия ИА (недостатки вакцины, особенности адъюванта и т.п.). Более того, получается что «хитозан» одновременно и является и не является иммуноадъювантом.

Аналогичная картина имеет место и в результатах трудов по оценке адъювантов на основе хитозана и его производных в составе различных других вакцин против инфекционных агентов человека и животных [52] (не только против гриппа), а также модельных антигенов (см. также Табл. 3 [28, 37, 49, 55]).

Таблица 3 – Адъюванты на основе хитозана (различные вакцины)

| вакцина | способ введения | хитозан |
|------------------------------|------------------------|---------------------------|
| анатоксин дифтерийный | и/н | хитозан глутамат (UPG210) |
| анатоксин коклюшный | п/к | 150 кДа ММ, 75-85% СД |
| анатоксин столбнячный | и/н | хитозан средней ММ |
| овальбумин | п/к | 200-600 кДа ММ, 75-90% СД |

К сожалению, даже в клинических исследованиях описываются неполностью охарактеризованные адъюванты на основе хитозана, в том числе без подтверждения уровня бактериальных эндотоксинов (пирогенность) [46]. Так, у добровольцев использовался некий «хитозан глутамат» (!) для интраназальной (и/н) вакцины против гриппа, которая впрочем оказалась умеренно иммуногенной. Следует отметить, что аналогична ситуация и для клинических исследований вакцин против других патогенов [23, 38].

Таким образом, крайне актуально с научной точки зрения разобраться в проблеме, для чего необходимо провести сравнительное изучение ряда адъювантов на основе охарактеризованных субстанций хитозана, изготовленных в аналогичных и контролируемых условиях, а также отличающихся по основным ФХХ, определенных различными методами, чему и посвящена настоящая работа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Общая информация

За основу принимались материалы ВОЗ [56], методические указания и рекомендации [МР 0100/4430-06-34, МУ 3.3.2.1758-03 и МУК 4.1/4.2.588-96]; работы проводились в соответствии с санитарными нормами и правилами Российской Федерации [СП 1.3.2322-08, СП 2.1.7.2790-10].

2. Хитозан

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. 10) были получены из исходных методами ферментативного и кислотного гидролиза, а также реацетилирования (см. Рис. 2), за исключением хитозана 20-98, любезно предоставленного с.н.с. Центра Биотехнологии РАН, к.х.н. А.Н. Левовым [21].

Очистку хитозанов (получение субстанций) проводили следующим способом: 1 г хитозана 1000-85 растворяли в 40 мл 1 М уксусной кислоты и 110 мл воды (рН 3,8) в течение 4 ч; а 1 г хитозана 200-85 – растворяли в 100 мл 1% уксусной кислоты в течение 2 ч. Далее проводили фильтрование полученных 1% растворов хитозана и доводили рН к 8,0-8,5 титрованием 12% растворов аммиака до образования хлопьевидного осадка хитозана. Полученный осадок диализовали с 3-кратной сменой воды. По окончании диализа субстанции лиофильно высушивали (выход хитозана составил 90%).

Для ферментативного гидролиза использовали ФП, содержащий комплекс высокоактивных карбогидраз, продуцируемый мицелиальным грибом *Myceliophthora fergussi* UV-64 ВКМ F-3932D (Всероссийская коллекция микроорганизмов при ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Московская обл.). Хитозаназную активность ФП оценивали по образованию восстанавливающих сахаров в результате процесса расщепления гликозидных связей в полимерной цепи [39]. За единицу хитозаназной активности принято количество фермента, которое катализирует выход 1 мкмоль ГА за минуту.

Гидролиз проводили следующим образом: 1 г хитозана 1000-85 растворяли в течение 2 ч в 40 мл 1 М уксусной кислоты при перемешивании, затем добавляли 116 мл воды (рН 3,8). Полученный раствор хитозана подщелачивали 1 М гидроксидом натрия до рН 5,6 (44 мл), термостатировали при 55 °С, после чего добавляли ферментный препарат. Гидролиз проводили в течение 15 мин. Продукты реакции выделяли из реакционной среды добавлением 12% раствора аммиака до значений рН 8,5-9,5. Диализовали против воды с 3-кратной сменой и лиофильно высушивали.

Реацетилирование проводили с использованием уксусного ангидрида в водно-спиртовой среде [9]. Соотношение растворителей 1% уксусная кислота:метиловый спирт составляло 60:100 мл/мл на 1 г исходного хитозана. Для получения хитозана с СД 30% на 1 г хитозана 200-85 затрачивалось 600 мкл уксусного ангидрида.

Также использовали производные хитозана (СХ; ООО «Биопрогресс», Щелково, Московская обл.) и хитозаны иностранного происхождения (Sigma-Aldrich, Германия) (см. Табл. 10).

3. ФХХ хитозана

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).

3.1. Метод кондуктометрического титрования

КТ проводили следующим образом: 200 мг хитозана растворяли в 20 мл 0,1 М соляной кислоты, далее добавляли 80 мл дистиллированной воды. Полученный раствор титровали 0,1 М гидроксидом натрия, добавляя его порциями по 0,1 мл через каждые 30 с при постоянном перемешивании. Значения электропроводности регистрировали на кондуктометре Hanna HI 8733 (Hanna Instruments, Румыния).

Объем щелочи, пошедшей на титрование, определяли по первой точке перегиба на кривой титрования. Расчет вели по формулам 1, 2:

$$x = N1 \times V1 - N2 \times V2, \quad (1)$$

$$СД = \frac{x}{x + \frac{m \times 0,9 - x \times 161}{203}} \times 100\%, \quad (2)$$

где

$V1$ – объем кислоты, л;

$V2$ – объем щелочи, необходимый для титрования, л;

$N1$ – нормальность кислоты, моль-экв/л;

N_2 – нормальность щелочи, моль-экв/л;

m – масса хитозана, г;

161 – молекулярная масса элементарного звена хитозана, г/моль;

203 – молекулярная масса ацетилированного звена хитозана, г/моль;

0,9 – коэффициент учета 10% влаги в исходной навеске образца.

3.2. Метод ядерного магнитного резонанса

Протонные (^1H ЯМР) спектры хитозана регистрировали на спектрометре Bruker AMX 400 (Bruker Scientific Instruments, США) с рабочей частотой по протону 400 МГц при температуре 32 °С. Субстанции готовили в дейтерированной воде. В качестве стандарта использовали 4,4-диметил-4-силапентан-сульфоновую кислоту. Расчет спектральных данных проводили с использованием формулы 3 [29]:

$$\text{СД} = \left(1 - \left(\frac{1}{3} \times I_{\text{CH}_3} / \frac{1}{6} \times I_{\text{H}_2\text{-H}_6}\right)\right) \times 100\%, \quad (3)$$

где

I_{CH_3} – интегральная интенсивность сигнала для группы CH_3 ;

$I_{\text{H}_2\text{-H}_6}$ – сумма интегральных интенсивностей для протонов Н во 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 6'-м положениях.

3.3. Метод УФ спектроскопии

Измерения и расчет проводили согласно методике [50] с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-1601 PC (Shimadzu Corporation, Япония). Спектры поглощения детектировали в диапазоне длин волн 190-230 нм. Поглощение определяли по первой производной спектра при длине волны 203 нм.

Подготовку проб проводили следующим образом: 10 мг хитозана растворяли в 10 мл 0,02 М уксусной кислоты. Измерения проводили при различных концентрациях хитозана: 0,1 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,025 мг/мл.

СД рассчитывали по формуле 4:

$$\text{СД} = 100 - \left(\frac{A}{(m - 204 \times A) / 161 + A} \right) \times 100, \quad (4)$$

где

A рассчитывается по формуле 5:

$$A = \frac{A1}{204}, \quad (5)$$

где

A1 – поглощение, полученное от первой производной спектра поглощения АГА, г;

204 – молекулярная масса АГА (звена хитина), г/моль;

161 – молекулярная масса ГА (звена хитозана), г/моль;

m – навеска хитозана, г.

3.4. Метод капиллярной вискозиметрии

Средневязкостную ММ хитозана определяли методом капиллярной вискозиметрии (M_v) с использованием уравнения Марка-Хаувинка по формуле 6:

$$\eta = k \times M^\alpha, \quad (6)$$

где

η – характеристическая вязкость, дл/г;

M – M_v (средневязкостная ММ).

k и α – коэффициенты, рассчитывающиеся по формулам 7 и 8 [54]:

$$k = 1,64 \times 10^{-30} \times \text{СД}^{14} \quad (7)$$

$$\alpha = -1,02 \times 10^{-2} \times \text{СД} + 1,82 \quad (8)$$

где

СД – степень деацетилирования, %;

Для хитозана с СД 85% k составляет $1,38 \times 10^{-4}$, а $\alpha = 0,85$ [6].

Измерение вязкости растворов хитозана проводили с использованием вискозиметра Убеллоде (ИНЭОС РАН, Москва) с диаметром капилляра 0,4 мм. Для хитозана с СД 85% измерения проводили при температуре 25 °С с использованием в качестве растворителя 2% (0,33 М) уксусной кислоты и 0,2 М ацетата натрия в соотношении 1:1. Для хитозана с другими СД – при температуре 30 °С в растворителе: 0,2 М уксусная кислота и 0,1 М ацетат натрия в соотношении 1:1.

3.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) ММ, а также ИП определяли методом ВЭЖХ на приборе S 2100 (Sykam, Германия) с использованием колонки (7,8x300 мм) Ultrahydrogel 500 (Waters, США) и предколонки (5x2 мм) GFC-4000 (Phenomenex, США). В качестве элюента использовали 0,05 М уксусную кислоту, 0,15 М ацетат аммония (pH 5,1), с расходом 0,5 мл/мин при температуре 30 °С [14]. В качестве детектора использовали рефрактометр RI Detector K-2301 (Knauer, Германия). Данные обрабатывали с помощью программы «Мультихром» (ЗАО «Амперсенд», Москва).

Калибровку колонки для ВЭЖХ осуществляли с использованием декстранов с молекулярной массой от 1 до 400 кДа (Sigma-Aldrich, Германия).

4. Аминокислотный анализ и LAL-тест

Определение остаточного белка в субстанциях хитозана проводили с использованием аминокислотного анализа (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова).

Эндотоксины определяли методом хромогенного LAL-теста по конечной точке с использованием набора Charles River Endosafe, США (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва).

5. Адьюванты

Адьюванты на основе хитозана готовили как 1,0% растворы в глутаминовой кислоте, после растворения pH доводили до 5,01 с использованием 1 М гидроксида натрия. СХ растворяли в воде, pH 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 [19]: суспензию и эмульсию по типу «масло в воде» на основе сквалена (Табл. 4).

Таблица 4 – Адьюванты сравнения

| условное обозначение | полное название | источник | доза |
|-----------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------|
| МЭ | эмульсия по типу «масло в воде» на основе сквалена | экспериментальные препараты [19] | 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 |
| CpG | олигонуклеотид CpG | Синтол, Москва | 10 мкг на мышь на иммунизацию |

6. Животные и культуры клеток

Использовали 9-дневные куриные эмбрионы (КЭ; ФГУП «ППЗ «Птичное», Московская обл.). Получение суспензии эритроцитов кур проводили после выдерживания 9-дневных КЭ при 34 °С в течение 3-4 дней (до возраста 12-13 дней).

Использовали группы нелинейных мышей (белые, беспородные, самки, весом 14-16 г на момент первой иммунизации; ФГБУН «НЦБМТ», филиал «Андреевка», Московская обл.). Работа с животными (мышами) в виварии проводилась в соответствии с локальными правилами и актами; мыши до начала работы проходили карантин.

На все партии животных предоставлялось ветеринарное свидетельство.

Использовали перевиваемую линию культур клеток почки собаки, MDCK (банк культур клеток ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва). Исходная культура прошла 18-22 пассажа. Культуры клеток после размораживания проходили 2-3 пассажа.

7. Вирусы и вакцины

В работе использовали штаммы вируса гриппа человека и животных, полученные из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва (Табл. 5).

Таблица 5 – 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) |

Вирусы нарабатывали путем пассирования в КЭ (48 ч при 36 °С). После пассажа, охлаждения и поэтапного центрифугирования и ультрацентрифугирования проводили ресуспендирование в ФСР. После накопления вирусные препараты контролировали на стерильность, а также биологическую активность: гемагглютинацию (ГАЕ/0,05 мл; с эритроцитами кур), инфекционность (ЭИД₅₀/0,1 мл, титрование в КЭ; ЦПД₅₀/0,1 мл – в MDCK). Кроме того, вирусные препараты PR8 контролировали по инфекционной активности на мышах (ИД₅₀/0,05 мл): животных заражали и/н под частичным эфирным наркозом, через 72 ч после инфекции проводили эвтаназию (эфир) и из легких с помощью КЭ выделяли вирусы.

Экспериментальные моновалентные инактивированные цельновирионные вакцины готовили следующим образом [4]: инаktivацию проводили 0,05% формальдегидом (2 ч при 36 °С). Удаление инаktivирующего агента проводили ультрацентрифугированием. Вакцины проверяли на полноту инаktivации (в КЭ), а также стерильность.

8. Иммуноадьювантная активность

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 адьюванта 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, полученные сыворотки и экстракты легких (10%) сразу же замораживали на -24°C . Обработку и анализ биоматериала после 1- и 2-кратной иммунизации, а также в опытных и контрольных группах проводили одновременно.

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°C в течение 30 мин. Для РН сыворотки после очистки сразу разводили в ФСР до 1:10 и прогревали. Экстракты легких для РЗГА и РН 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 повторях при рабочей дозе

вируса 8 ГАЕ/0,05 мл, РН (МДСК) – аналогичным образом при рабочей дозе вируса 100 ЦПД₅₀/0,1 мл. Минимальный определяемый титр для РЗГА и РН составил 1:5.

Постановку ELISA осуществляли следующим образом. Вирусные препараты сорбировали на 96-луночные полистироловые планшеты высокой сорбции (Corning, США) при 36 °С в течение 1 ч и блокировали 0,2% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА; Sigma-Aldrich, США). После 5-кратной промывки ФСП в лунки добавляли по 100 мкл биоматериала и выдерживали в аналогичных условиях. После очередной промывки добавляли по 100 мкл конъюгата анти-мышь-IgG с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Германия) и выдерживали в тех же условиях. Затем, после очередной промывки, добавляли по 100 мкл тетраметилбензидина (ТМБ) и выдерживали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали 0,2 М серной кислоты в объеме по 50 мкл, 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 и/н 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 0,25 ЭИД₅₀/0,1 мл).

9. Статистическая обработка результатов исследований

Все биологические реакции титрования ставили не менее чем в 4 повторях, 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 являлись существенными.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава 1. Получение и характеристика субстанций хитозана

В начале исследований нарабатывали и характеризовали субстанции хитозана для дальнейшего приготовления на их основе адъювантов для вакцин против гриппа. Схема получения субстанций хитозана представлена на Рис. 2.



Рисунок 2 – Схема получения субстанций хитозана

В ходе очистки исходного материала 1000-85 отмечалось снижение ММ, которое не наблюдалось для хитозана 200-85, причем без изменения СД в обоих случаях.

НМ хитозан 10-85 получали ферментативным способом – деполимеризацией высокомолекулярного (ВМ) хитозана 1000-85. На первом этапе данной работы исследовали рН (Табл. 6) и температурный режим (Табл. 7), затем – подбирали соотношение Ф/С (Табл. 8) и продолжительность гидролиза (Табл. 9). При подборе соотношения Ф/С и времени реакции учитывали, что конечное содержание белка и ИП должны быть минимальны.

Совокупность полученных данных позволила выбрать следующие условия (выход 50%):

- рН 5,6;
- температура 55 °С;
- Ф/С – 1:800
- продолжительность – 2 ч.

Таблица 6 – Активность ФП в зависимости от рН

| рН | 3,7 | 4,4 | 5,0 | 5,6 |
|---|------------|------------|------------|------------|
| хитозаназная активность, ЕД/мин мг белка | 3,6 | 3,6 | 4,1 | 4,4 |

Таблица 7 – Активность ФП в зависимости от температуры

| температура, °С | 25 | 30 | 37 | 45 | 50 | 55 |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| хитозаназная активность, ЕД/мин мг белка | 4,2 | 4,4 | 4,4 | 4,4 | 5,9 | 7,4 |

Таблица 8 – Влияние соотношения Ф/С на ММ продуктов гидролиза

| ФП на 1 г хитозана, мг | Ф/С | ММ, кДа | белка на 1 г хитозана, мг |
|-------------------------------|------------|----------------|----------------------------------|
| 40 | 1:400 | 20 | 2,5 |
| 20 | 1:800 | 24 | 1,25 |
| 10 | 1:1600 | 35 | 0,63 |
| 5 | 1:3200 | 45 | 0,3 |
| 3 | 1:5000 | 53 | 0,2 |

Таблица 9 – ММ хитозана в зависимости от продолжительности гидролиза

| ч | M_v, кДа | M_w, кДа | M_n, кДа | ИП |
|----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| 1 | 19 | 64 | 22 | 2,9 |
| 2 | 10 | 18 | 9 | 2,1 |
| 4 | 8 | 14 | 6,5 | 2,1 |
| 6 | 5 | 7,5 | 3,7 | 2,04 |

На данном этапе работы также был сформирован набор охарактеризованных субстанций хитозана по ММ и СД (Табл. 10) и чистоте (Табл. 11); на основе которых были приготовлены соответствующие адьюванты для вакцин.

Таблица 10 – 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 |

Таблица 11 – Показатели чистоты субстанций хитозана

| хитозан (ММ-СД) | белок, % | эндотоксины, ЕЭ/мл |
|-----------------|----------|--------------------|
| 700-85 | 0,04 | 123 |
| 10-85 | 0,15 | 67 |
| 300-85 | 0,12 | 115 |
| 250-85 | 0,19 | 175 |

Таким образом, создан набор адъювантов на основе охарактеризованных субстанций хитозана для оценки их ИА на модели вакцин против гриппа.

Глава 2. ИА препаратов на основе хитозана в составе вакцин против гриппа

В основной части исследований проводили оценку ИА адьювантов на основе охарактеризованных субстанций хитозана в составе инактивированных вакцин против гриппа человека и животных, вводимых мышам в/м, через иммуногенность по титрам антител в сыворотках и легких, а также по защитному эффекту.

2.1. Иммуногенность адьювантов на основе хитозана в составе вакцин H5N1

В первых сериях экспериментов изучали иммуногенность адьювантов в составе вакцины H5N1; титры антител в сыворотках по РЗГА и РН в отношении вакцинного штамма представлены на Рис. 3 и 4, соответственно.

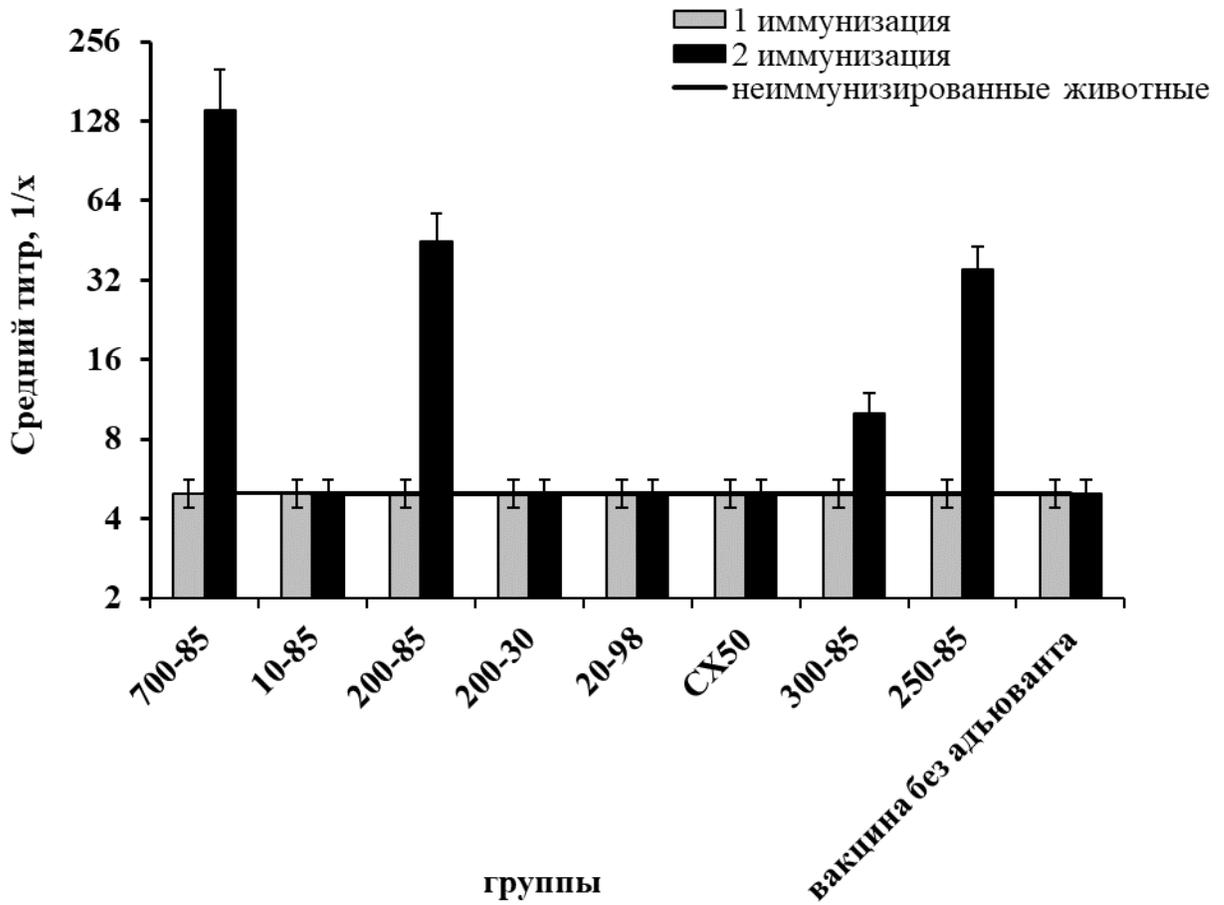


Рисунок 3 – Иммуногенность (РЗГА, сыворотки) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины H5N1 в отношении вакцинного штамма

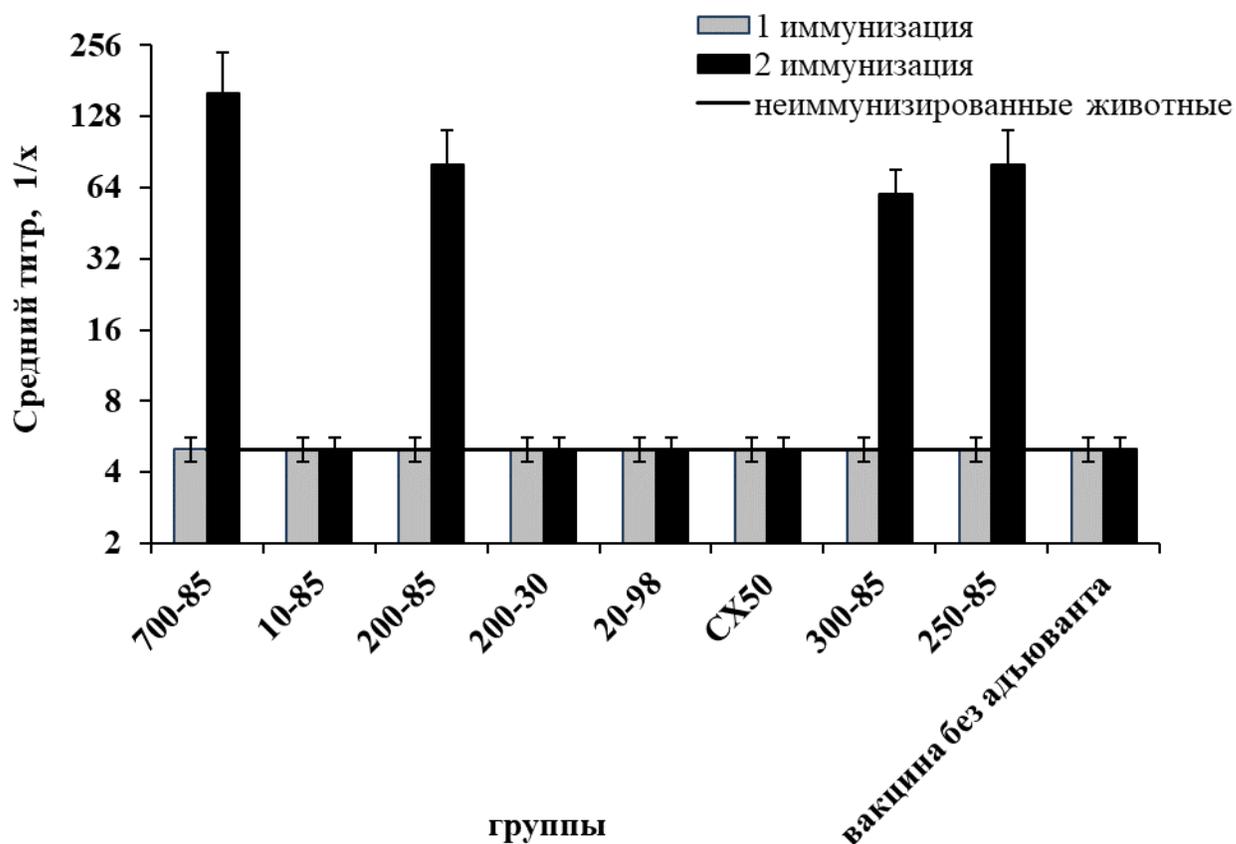


Рисунок 4 – Иммуногенность (РН, сыворотки) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины H5N1 в отношении вакцинного штамма

Результаты этой серии экспериментов показали, что ни один адьювант не был иммуногенным после 1-кратной иммунизации, однако после 2-кратной иммунизации наибольшая иммуногенность отмечалась для хитозана 700-85, при этом титры более 1:40 наблюдались также для хитозанов с высокой ММ и СД.

В следующей серии экспериментов изучали иммуногенность адьювантов в составе вакцины H5N1 против гетерологичного по NA штамма H5N2; титры антител в сыворотках по РЗГА представлены на Рис. 5.

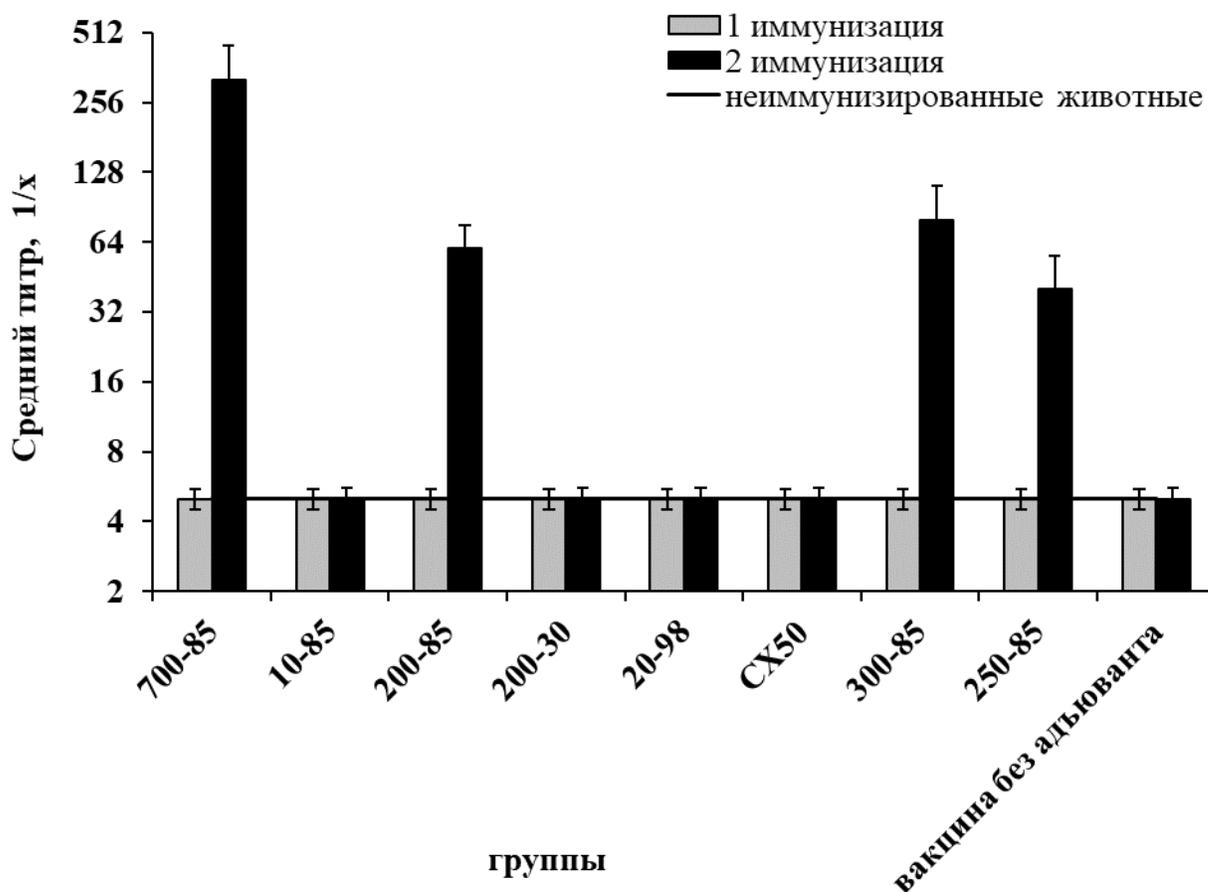


Рисунок 5 – Иммуногенность (РЗГА, сыворотки) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины H5N1 в отношении гетерологичного штамма H5N2

Результаты этой серии экспериментов показали, что ни один адьювант не был иммуногенным после 1-кратной иммунизации, однако после 2-кратной иммунизации наибольшая иммуногенность отмечалась для хитозана 700-85 (средний титр достигал 1:320), при этом титры более 1:40 наблюдались также для хитозанов с высокой ММ и СД.

Что касается иммуногенности по РН, то ни для одной комбинации вакцины и адьюванта антитела в сыворотке в пределах чувствительности метода не определялись.

Таким образом, адьюванты 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, но также и гетерологичного штамма. Наибольшая иммуногенность отмечалась для хитозана 700-85.

2.2. Иммуногенность адьювантов на основе хитозана в составе вакцин SOIV

В следующих сериях экспериментов изучали иммуногенность адьювантов в составе вакцины SOIV; титры антител в сыворотках по РЗГА и РН в отношении вакцинного штамма представлены на Рис. 6 и 7, соответственно.

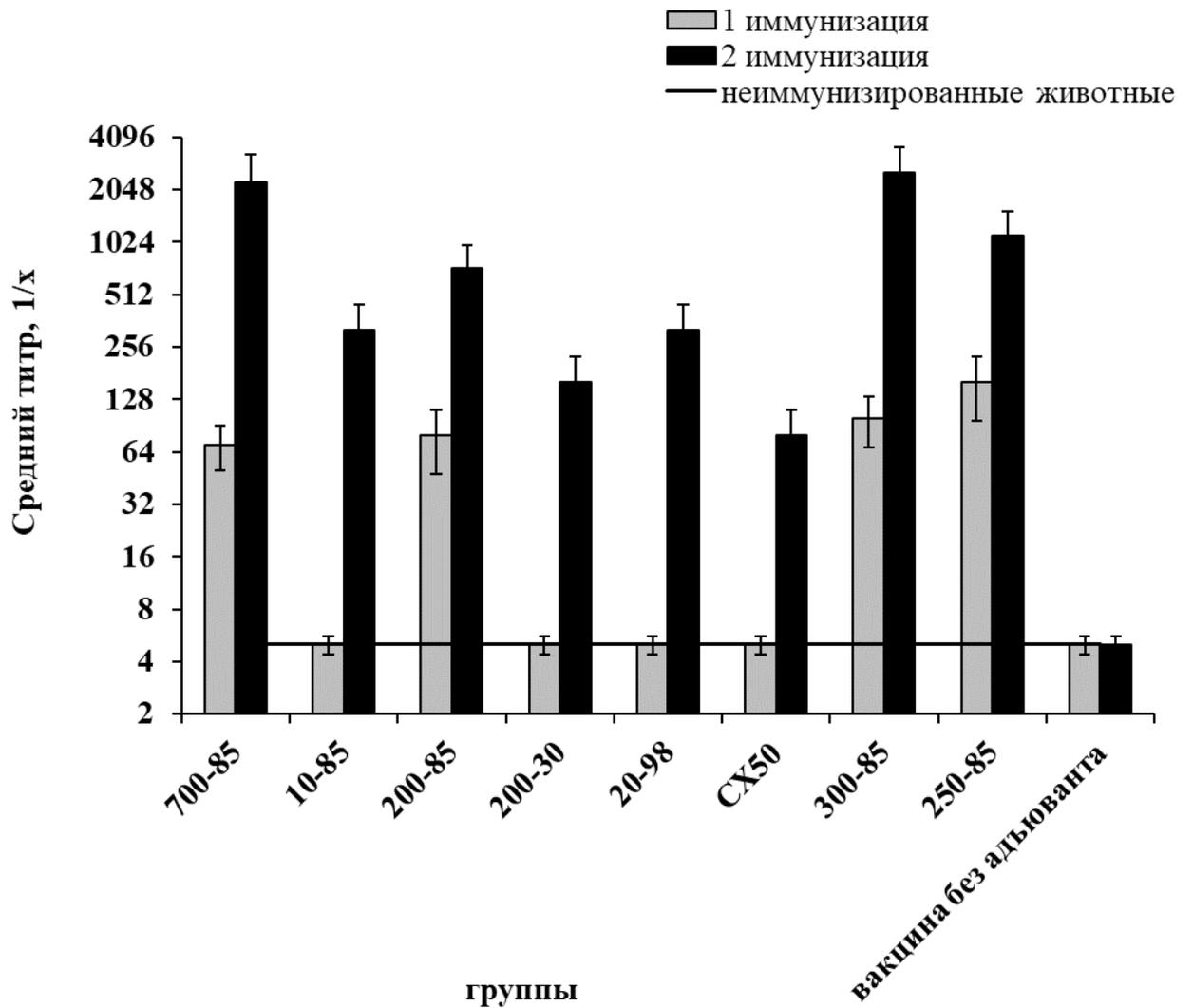


Рисунок 6 – Иммуногенность (РЗГА, сыворотки) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины SOIV в отношении вакцинного штамма

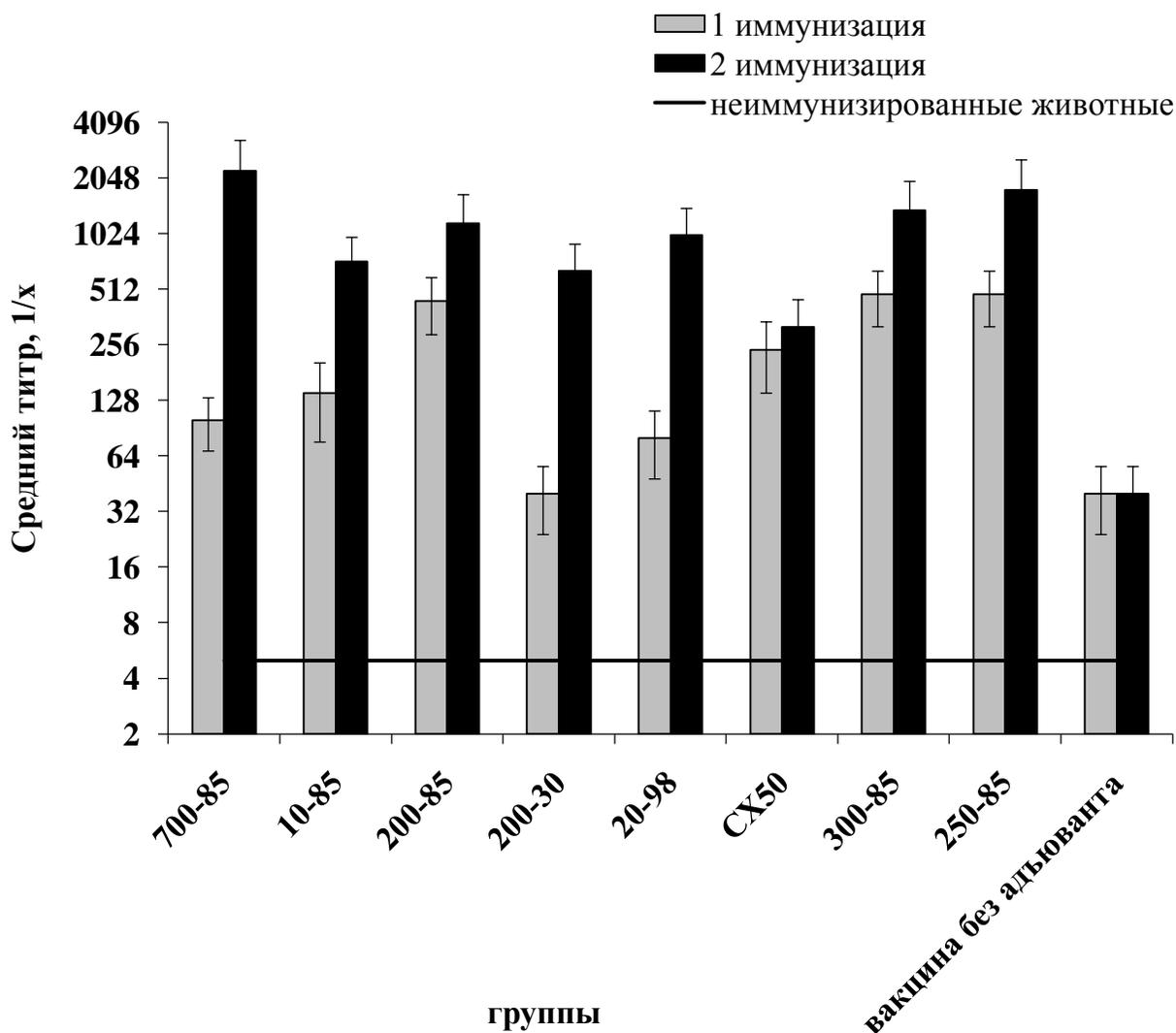


Рисунок 7 - Иммуногенность (РН, сыворотки) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины SOIV в отношении вакцинного штамма

Результаты этой серии экспериментов показали, что 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) 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.

Таким образом, адъюванты на основе охарактеризованных субстанций хитозана с высокой ММ и СД оказались наиболее иммуногенными для инактивированных вакцин против гриппа свиного происхождения SOIV. Наибольшая иммуногенность отмечалась для хитозана 700-85, а также в 300-85.

На основании нескольких серий экспериментов (см. Глава 2, п. 2.1. и 2.2.) были отобраны наиболее перспективные адъюванты, а также препараты сравнения на основе хитозана с принципиально отличными ФХХ (ММ), которые и изучались в дальнейших исследованиях.

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

В завершающей серии экспериментов изучали иммуногенность и защитный эффект адъювантов-кандидатов на основе хитозана в составе вакцины PR8, причем определяли титры антител в сыворотках и легких по РЗГА, РН и уровень IgG антител (ELISA).

Титры антител в сыворотках по РЗГА в отношении вакцинного штамма представлены на Рис. 8 и 9, соответственно.

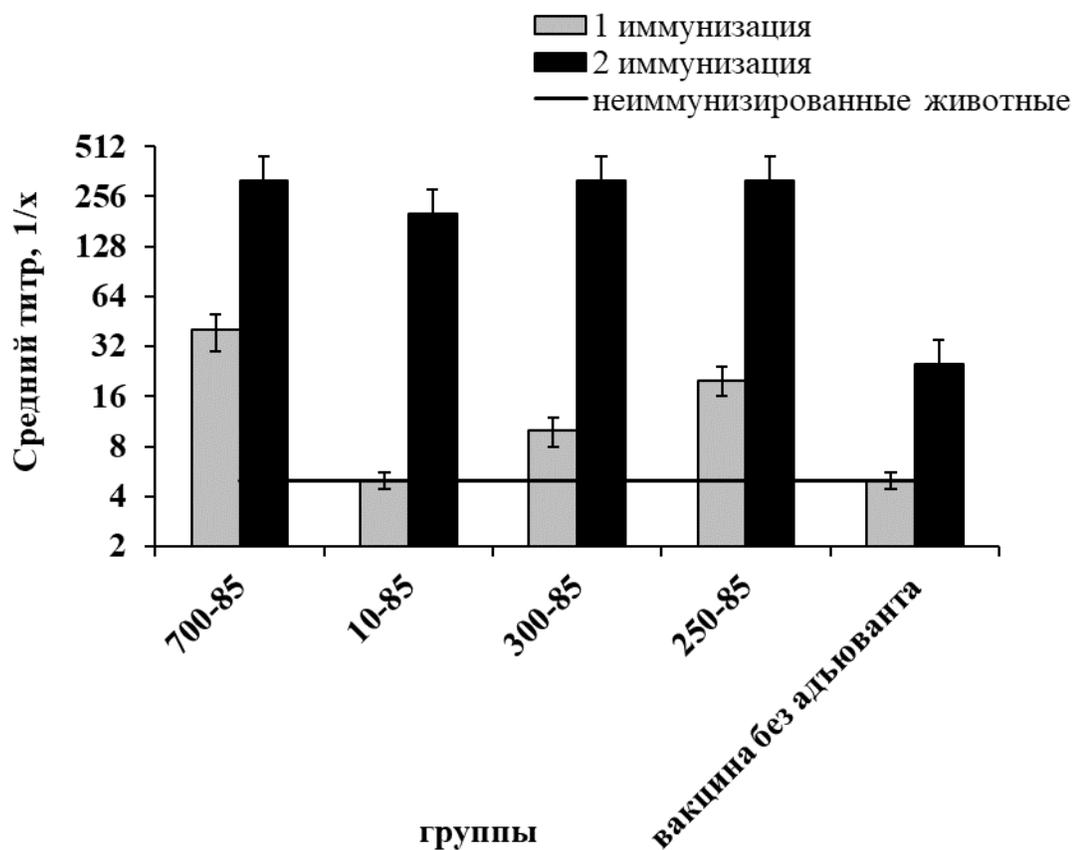


Рисунок 8 – Иммуногенность (РЗГА, сыворотки) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины PR8 в отношении вакцинного штамма

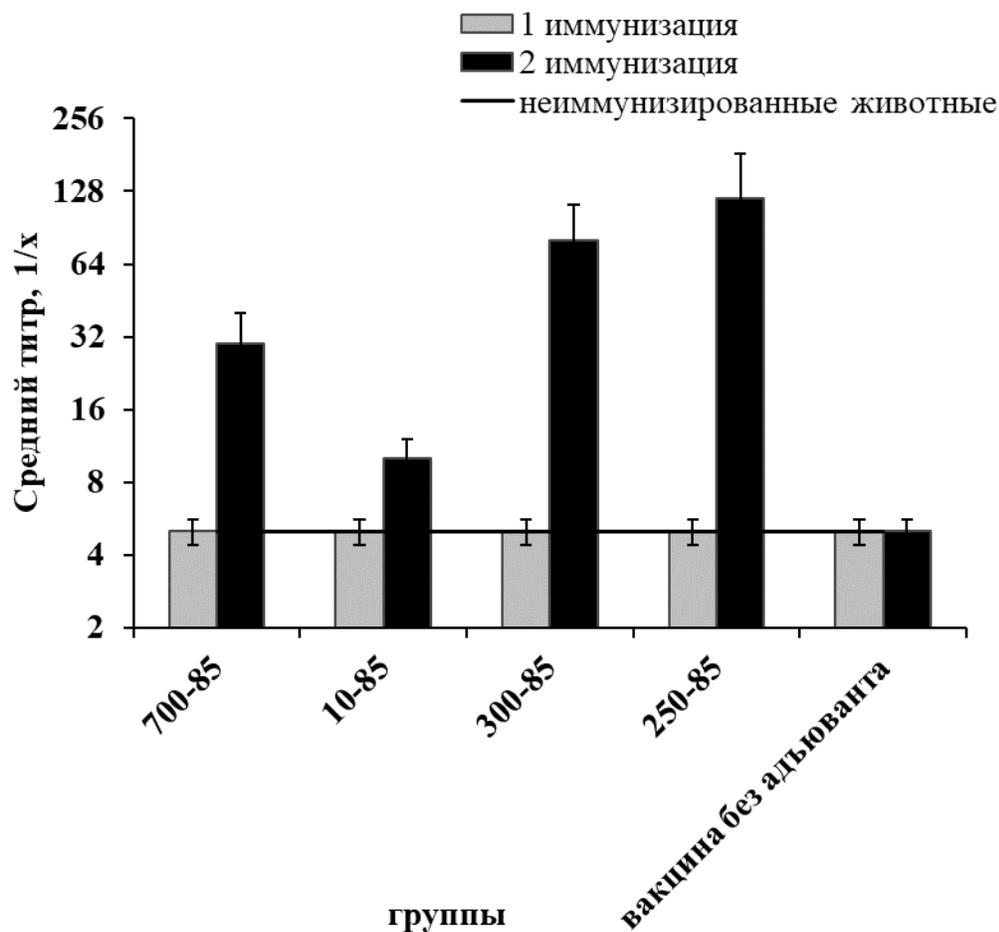


Рисунок 9 – Иммуногенность (РЗГА, легкие) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины PR8 в отношении вакцинного штамма

Результаты этой серии экспериментов показали, что после 1-кратной иммунизации наиболее иммуногенный по РЗГА (сыворотки) адьювант – хитозан 700-85, в то же время после 2-кратной все изученные адьюванты, в целом, обладали высокой иммуногенностью. В случае титров в легких – наиболее иммуногенными оказались хитозаны 300-85 и 250-85, причем только после 2-кратной иммунизации.

Аналогичные исследования по РН с сыворотками (Рис. 10) показали, что после 1-кратного введения наиболее иммуногенны хитозаны 700-85 и 250-85, а после 2-кратной иммунизации, в целом, все изученные адьюванты повышали

титры антител в сравнении с вакциной без адьюванта. Что касается иммуногенности по РН с антителами в легких, то ни одна комбинация адьюванта и вакцины не повышала иммуногенность, при этом титры антител в пределах чувствительности метода не определялись.

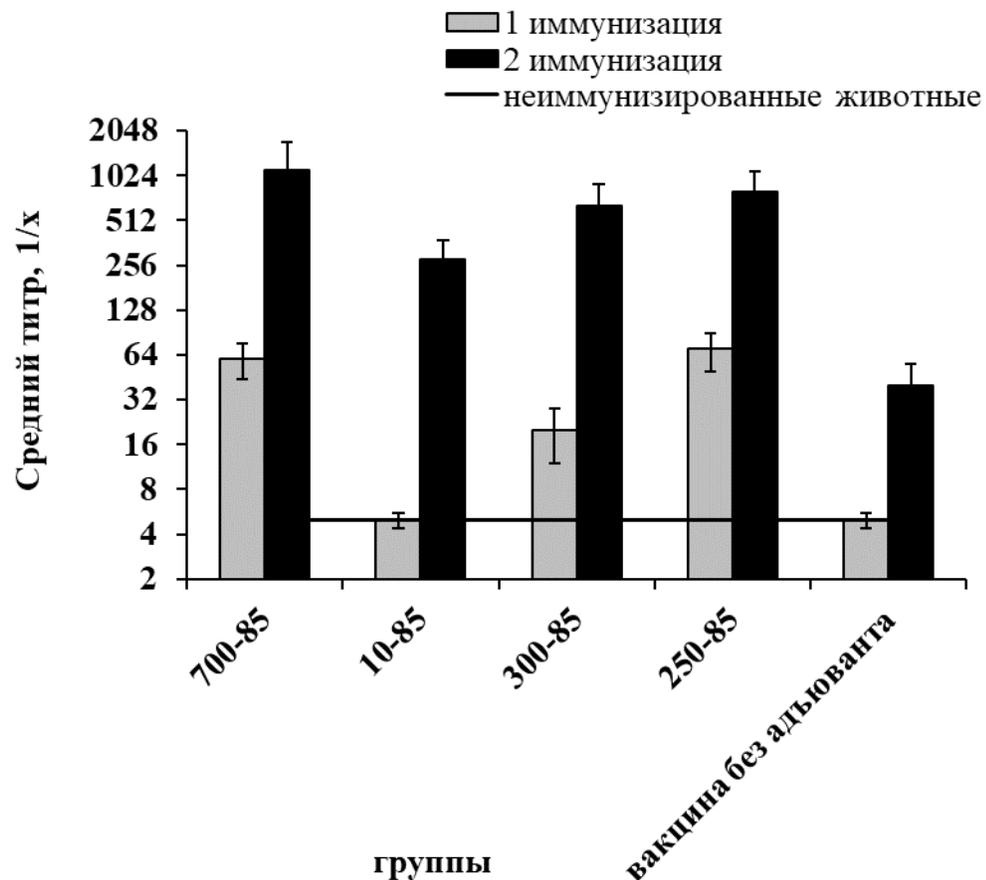


Рисунок 10 – Иммуногенность (РН, сыворотки) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины PR8 в отношении вакцинного штамма

Аналогичные исследования по уровню вирус-специфических IgG (ELISA) в сыворотках и легких (Рис. 11 и 12, соответственно) показали, что уже после 1-кратного введения хитозан 700-85 был весьма иммуногенен, а после 2-кратного, в целом, все изученные адьюванты были иммуногенны. При этом хитозан 700-

85 был несколько более иммуногенным по уровню IgG в сыворотках, а хитозан 250-85 – в легких.

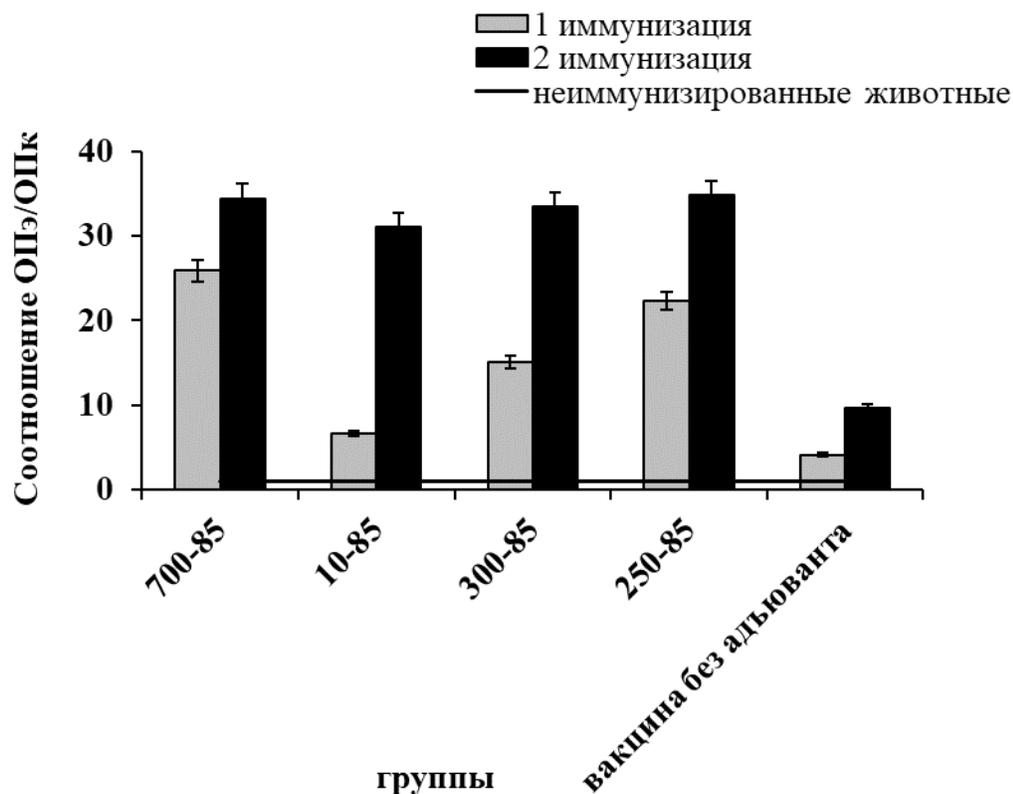


Рисунок 11 – Иммуногенность (IgG, сыворотки) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины PR8 в отношении вакцинного штамма

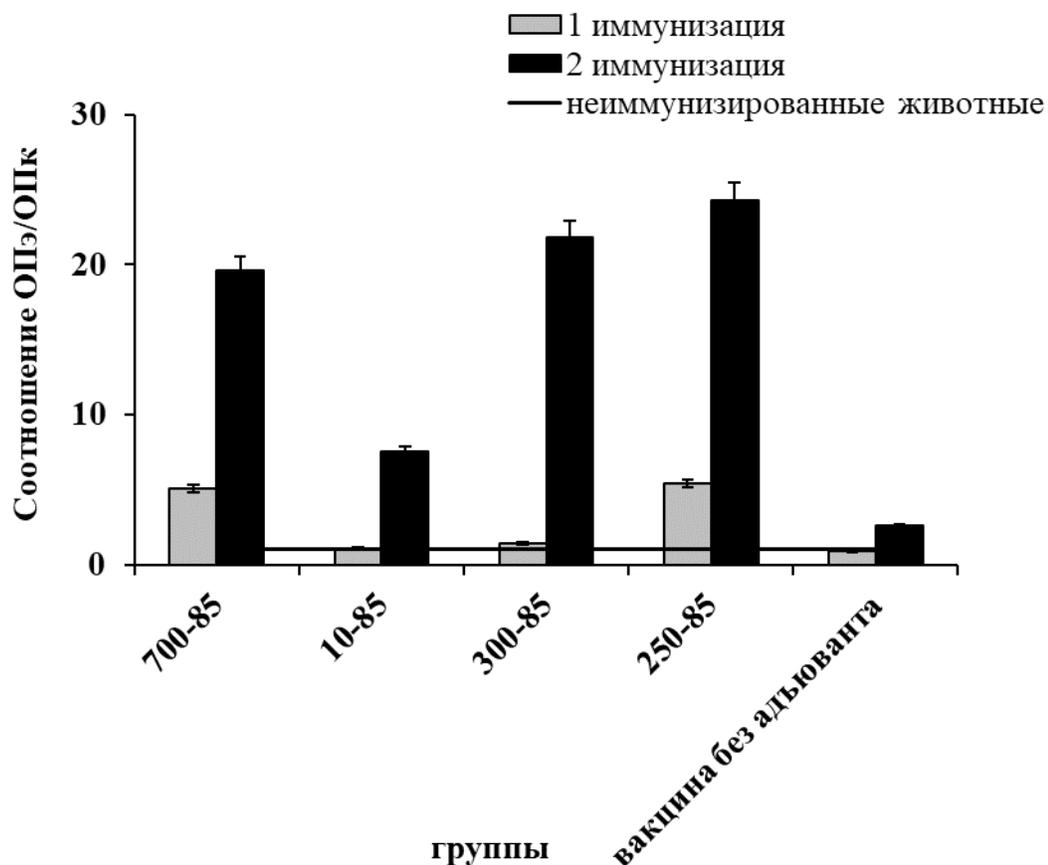


Рисунок 12 – Иммуногенность (IgG, легкие) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины PR8 в отношении вакцинного штамма

В этой серии экспериментов также изучали защитный эффект хитозанов в составе вакцины против PR8 в отношении дикого варианта этого вируса (Рис. 13). Результаты показали, что 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. 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.

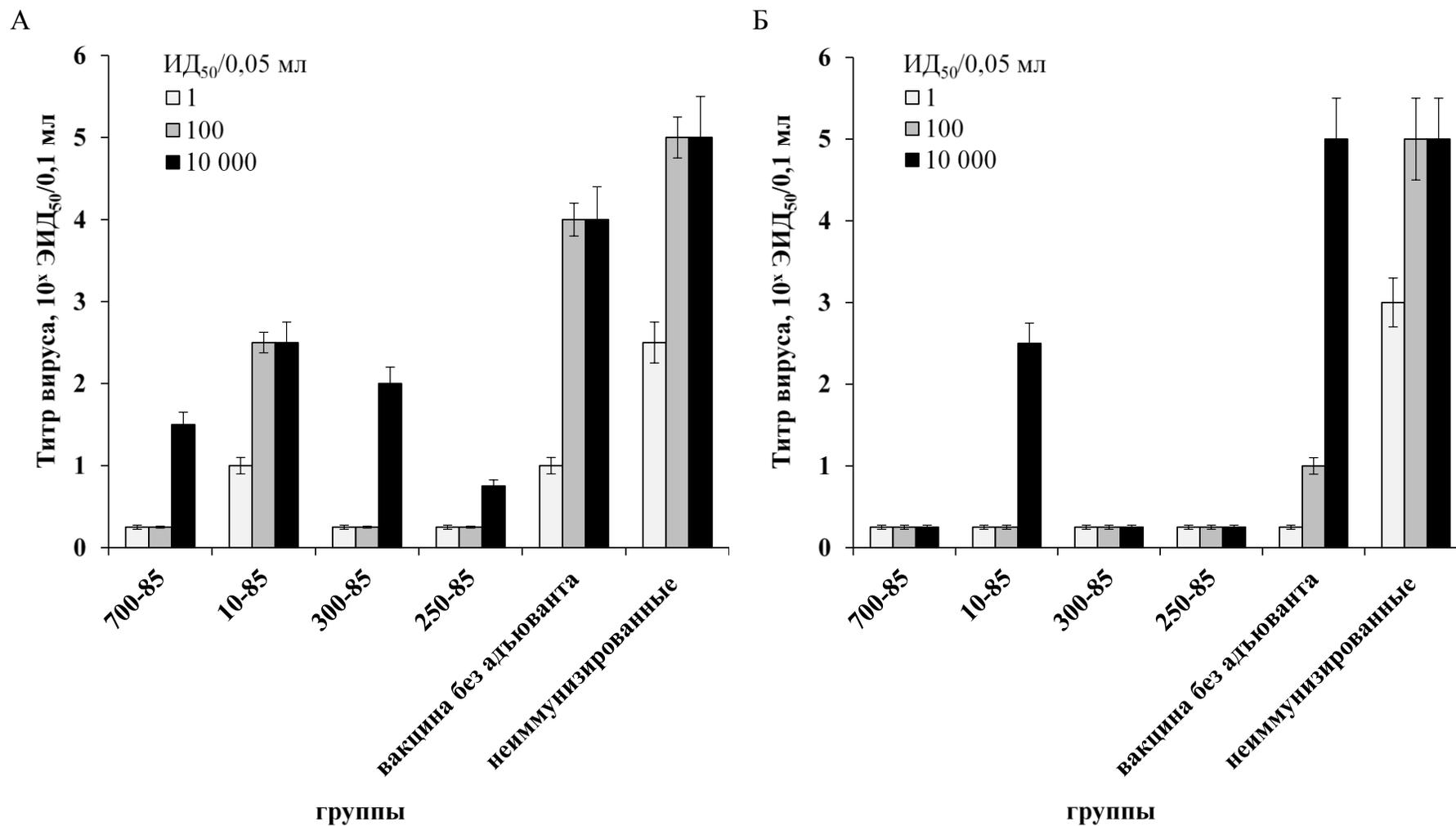


Рисунок 13 – Защитный эффект (дикий вариант PR8) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) в составе вакцины PR8 после 1- (А) и 2-кратной (Б) иммунизации

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) и, в определенной степени, в легких (IgG). Более того, хитозаны с высокой ММ и СД, в особенности 700-85, повышают не только иммуногенность вакцины PR8, но также обеспечивают полный защитный эффект.

Таким образом, наиболее иммуногенный адъювант на основе охарактеризованного хитозана по данным нескольких серий экспериментов с различными вакцинами против гриппа человека и животных – 700-85.

Глава 3. Сравнительное изучение иммуногенности адъювантов на основе хитозана и особенности механизмов ИА

В завершении исследований оценивали иммуногенность хитозана с высокой ММ и СД в сравнении с другими адъювантами (гидроксид алюминия, МЭ, МС и СpG), а также производными хитозана (СХ) и особенности механизмов ИА на модели вакцин против SOIV.

Результаты сравнительных исследований по РЗГА с сыворотками против вакцинного штамма (Рис. 14) показали, что хитозан как после 1-кратной, так и после 2-кратной иммунизации по иммуногенности не уступает МЭ и МС, а также существенно опережает по таковой гидроксид алюминия и СpG.

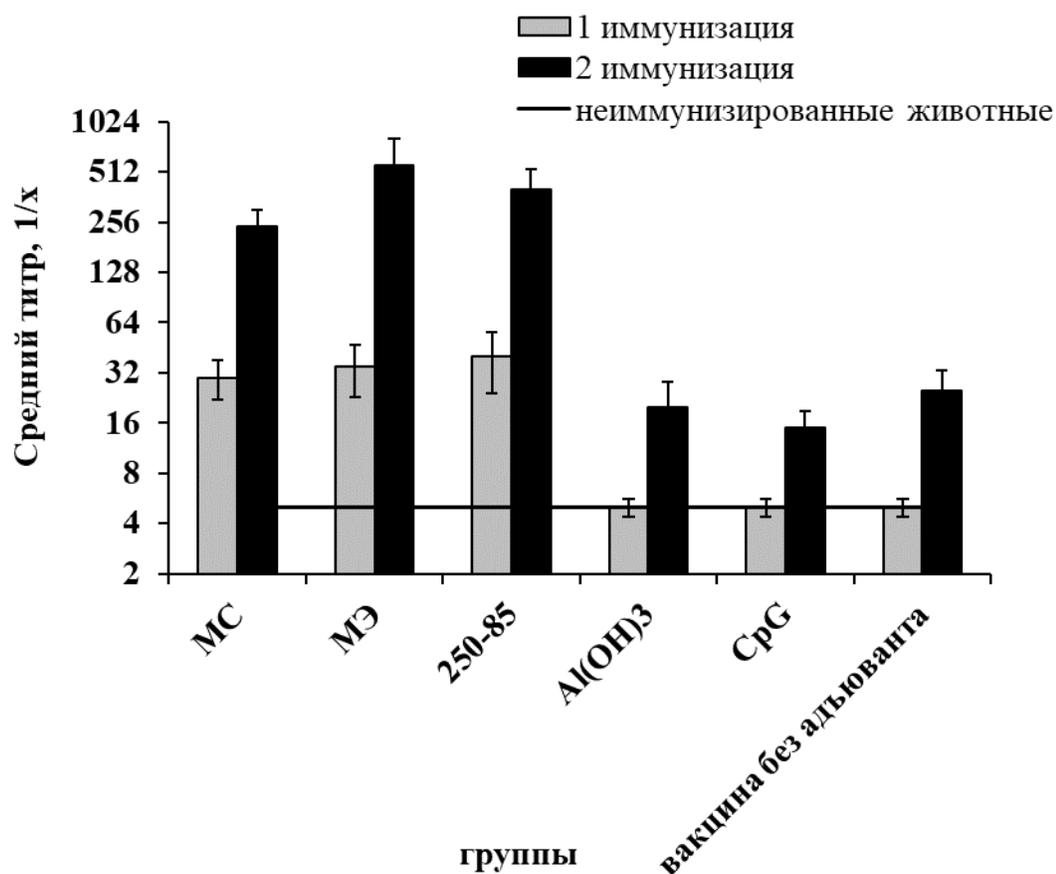


Рисунок 14 – Иммуногенность (РЗГА, сыворотки) препарата на основе хитозана в сравнении с другими адьювантами на модели инактивированной вакцины SOIV против вакцинного штамма

Оценка иммуногенности хитозана с различными ФХХ и его производных (СХ с различной СЗ) на модели вакцины SOIV по РЗГА с сыворотками против вакцинного штамма (Рис. 15) показала, что хитозаны с различной ММ и СД, но не СХ с различной СЗ (с учетом рН) иммуногенны после 1-кратной иммунизации. Наибольшая иммуногенность после 2-кратной иммунизации отмечалась для хитозана 700-85.

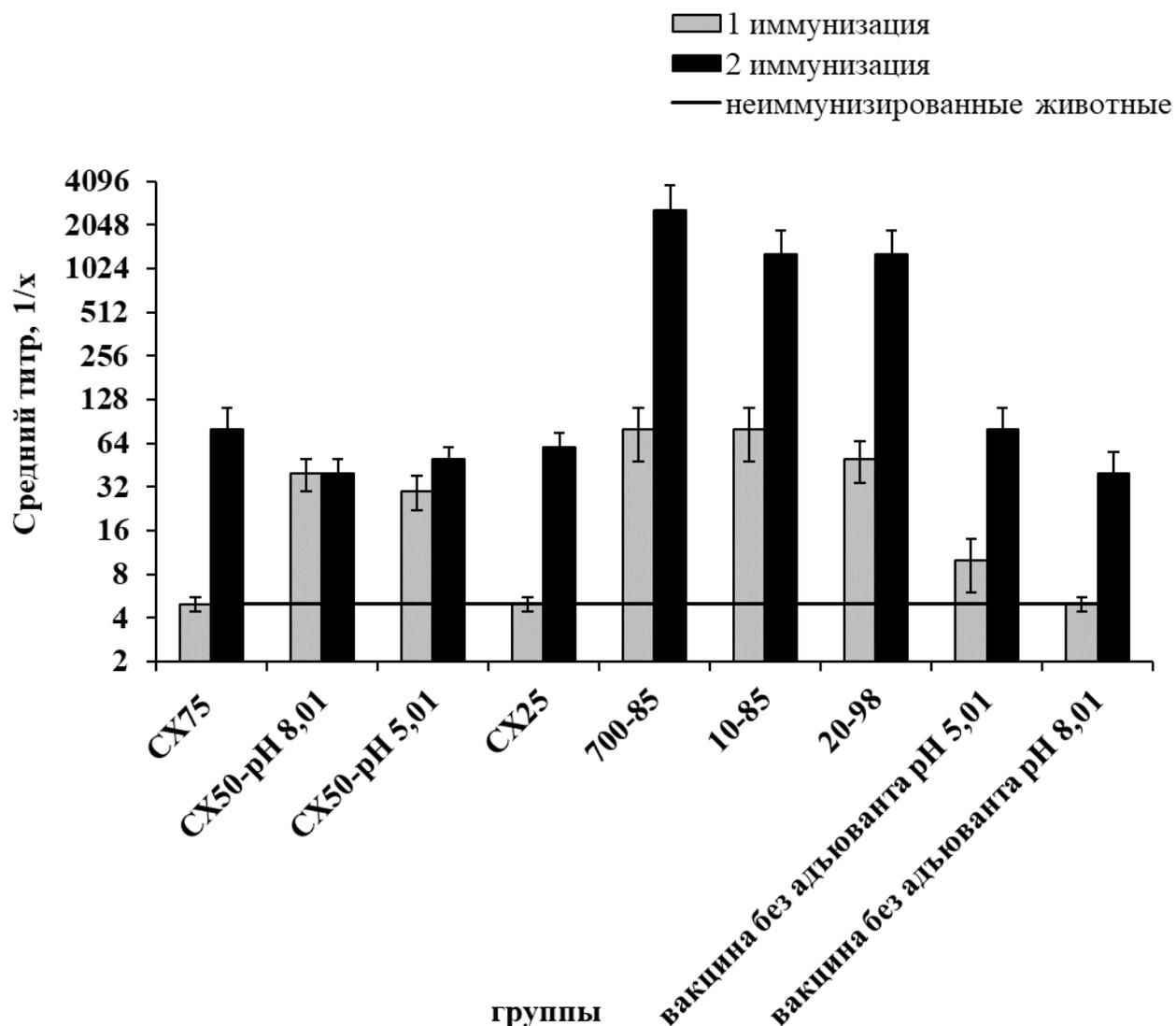


Рисунок 15 – Иммуногенность (РЗГА, сыворотки) адьювантов на основе хитозана (ММ-СД) и его производных в составе вакцины SOIV против вакцинного штамма

В последней серии экспериментов изучали особенности механизмов ИА хитозана – иммуногенность хитозана при введении совместно с вакциной SOIV («в одном шприце»), а также отдельно (в разные конечности). Результаты показали (Рис. 16), что хитозан обладает иммуногенностью только при совместном введении с вакциной (антигеном), то есть определяющим механизмом ИА является взаимодействие с антигеном.

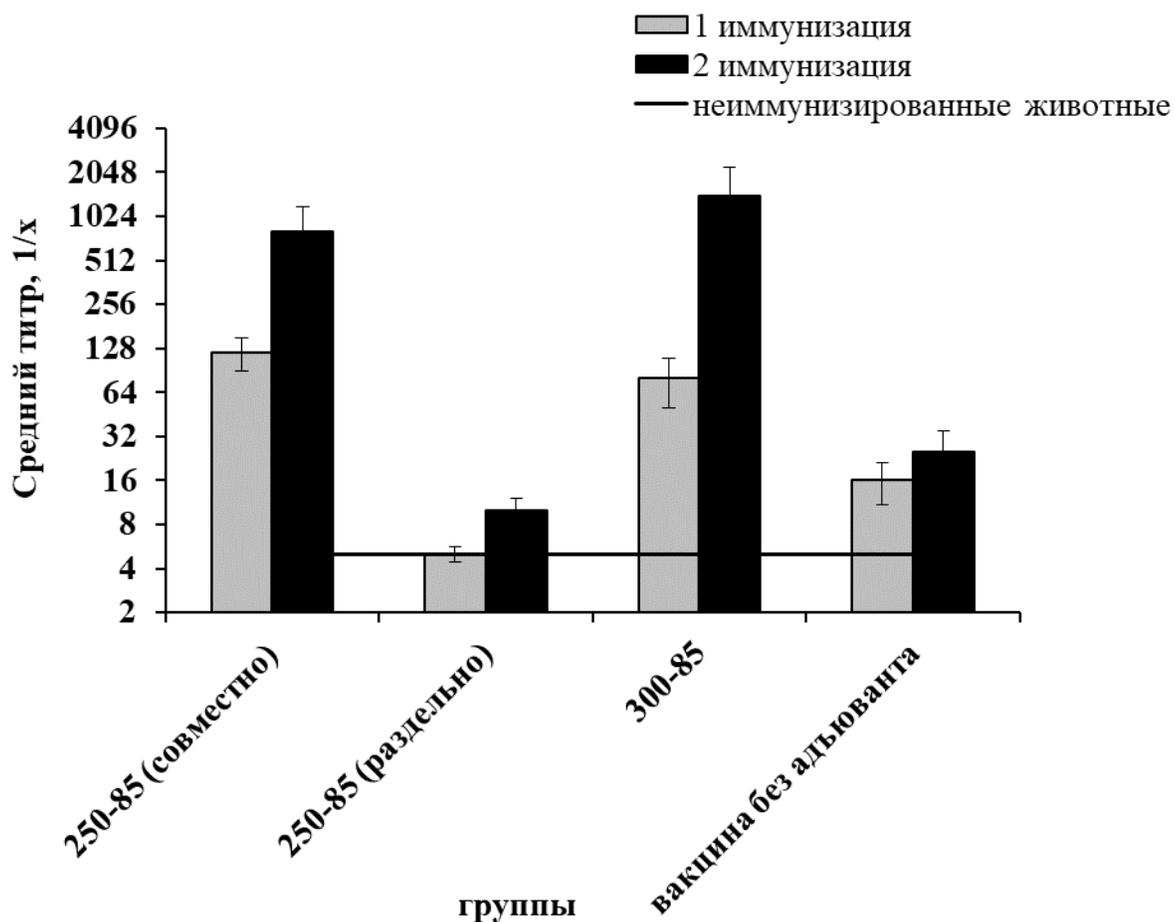


Рисунок 16 – Иммуногенность (РЗГА, сыворотки) хитозана при совместном и раздельном введении с вакциной SOIV против вакцинного штамма

Таким образом, иммуногенность хитозанов с высокой ММ и СД не уступает экспериментальным препаратам следующего поколения (МЭ и МС), в том числе эмульсии «масло в воде» на основе сквалена, а также превышает таковую гидроксида алюминия и CpG. Кроме того, именно хитозан, а не его производные (СХ) и лишь при совместном введении с вакциной (антигеном) повышает титры антител в сравнении с препаратом без адьюванта, то есть является иммуногенным.

Совокупность данных, полученных по работе в целом показывает, что хитозаны с различными ФХХ в составе инактивированных вакцин против гриппа человека и животных, вводимых мышам в/м, обладают неодинаковой ИА. В целом, наибольшая иммуногенность и защитный эффект отмечались для хитозанов с высокой ММ и СД. Практически во всех сериях экспериментов и вне зависимости от вакцинного штамма наибольшая иммуногенность (антитела по РЗГА, РН и IgG по ELISA в сыворотке и легких), а также защитный эффект наблюдались для хитозана 700-85. Более того, хитозан с высокой ММ и СД по ИА сравним с экспериментальными разработками следующего поколения (МЭ и МС) и превосходит гидроксид алюминия и CpG; при этом иммуногенность отмечается именно при совместном введении хитозана с антигеном и не характерна для производных хитозана (СХ).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Актуальность инфекционных заболеваний и роль вакцинопрофилактики в борьбе с ними трудно переоценить. Действительно, благодаря вакцинам была искоренена натуральная оспа, подходит к завершению программа ВОЗ по борьбе с полиомиелитом [8, 59, 61]. Тем не менее, имеющиеся вакцины неоптимально сочетают эффективность, безопасность, а также экономическую целесообразность, особенно при массовом применении.

Одним из наиболее перспективных направлений совершенствования имеющихся вакцин, в частности против гриппа, а также создания инновационных иммунобиопрепаратов в целом являются исследования и разработка адъювантов (иммуноадъювантов) [2, 3, 20]. Как отмечалось выше, идеальный адъювант позволит повысить эффективность вакцины, в том числе в группах риска (маленькие дети, пожилые люди, лица с иммунодефицитами), индуцировать широко перекрестный иммунный ответ, что особенно важно для препандемических вакцин [60], а также упростить схему иммунизации (понизить кратность вакцинации). За счет снижения дозы антигена появляется возможность вакцинировать больше людей при той же мощности производства, что особенно важно для пандемических вакцин. Более того, именно за счет возможности снижения дозы антигена в вакцине добавление адъюванта не только не повысит итоговую стоимость, но даже может ее снизить.

В настоящее время известны и исследуются адъюванты на основе минеральных солей и оснований (например, гидроксид и фосфат алюминия), эмульсии (например, «масло в воде» на основе сквалена и токоферола), иммуномодуляторы прямого действия (например, агонисты TLR), а также всевозможные их комбинации [20].

К числу одного из наиболее перспективных адъювантов-кандидатов нового поколения относится биополимер на основе ГА – хитозан, отличительными свойствами которого является уникальное сочетание биосовместимости и биodeградируемости, определяющая, в частности, безопасность применения [52].

Тем не менее, в изучении адъювантов для вакцин (иммуноадъювантов) на основе хитозана остро стоит ряд вопросов [52]. Основная проблема связана с тем, что под термином «адъювант на основе хитозана» различными авторами подразумеваются субстанции данного биополимера, собственно препараты адъюванта в различных физических состояниях (формах), а также всевозможные производные и комплексные препараты, одним из множества компонентов которого может быть хитозан.

Следует отметить, что в опубликованных материалах не указываются даже основные ФХХ хитозана (ММ и СД; см. также Табл. 3), тем более методы их определения (например, ВЭЖХ для ММ или ЯМР для СД), содержание примесей (белков и эндотоксинов) с методами их определения (например, аминокислотный анализ и ЛАЛ-тест, соответственно). Более того, немаловажные сведения о способе приготовления адъювантов из субстанций (растворитель (противоион), рН, способ стерилизации), подтверждении физического состояния препарата адъюванта (например, размер микрочастиц), а также доза адъюванта практически не упоминаются. Как следствие – описанные в научной литературе эксперименты невоспроизводимы, а результаты различных исследований невозможно сопоставить.

Необходимо отметить важность характеристики биополимеров по специфическим примесям (для хитозана – остаточный белок (особенно при ферментативном получении НМ препаратов) и эндотоксины), которые как мощные иммуномодуляторы могут определять ИА препарата, причем хитозан в

данном случае выступает как инертная система доставки (см., например [34] в части ложноположительной биологической активности).

Отсутствие указания на использованный подход и методики определения ФХХ, при том что общепринятых подходов и стандартизованных методик нет [14], приводит не только к искажению физико-химического смысла (так, ММ без пояснений может быть средневязкостной, средневесовой или среднечисленной; см. также [63] с хитозаном с СД 20%, то есть хитином), но и существенным различиям в числовом выражении, что наглядно иллюстрируется полученными нами данными, когда GMP субстанция известного международного поставщика имела несколько другие ФХХ, а НМ олигохитозан оказался ВМ (см. Табл. 12).

Таблица 12 – ФХХ субстанций хитозана

| хитозан (Sigma-Aldrich, Германия) | заявленные | | | экспериментальные | | | |
|--------------------------------------|-------------|------------|----------|-------------------|------------|------------|----------|
| | Mw, кДа | Mn, кДа | СД, % | Mv, кДа | Mw, кДа | Mn, кДа | СД, % |
| GMP | 110- 150 | - | >60 | 300 | 670 | 260 | 82 |
| олигохитозан лактат | - | 4-6 | >90 | 250 | 390 | 200 | 85 |

Более того, в случае ВЭЖХ помимо характеристик колонки, носителя и подвижной фазы, важно указывать использованный стандарт для калибровки; а при использовании метода вискозиметрии для определения ММ хитозана – следует учитывать изменения коэффициентов в расчетной формуле, которые в свою очередь зависят от СД.

Что касается данных научной литературы, то стоит обсудить исследование, где ИП хитозана указан на уровне более 6 [18], то есть разброс

ММ субстанции может быть в интервале, например, от 50 до 300 кДа (или от средних значений до VM).

Таким образом, несмотря на изобилие опубликованных данных [52] (в своем большинстве невозпроизводимых), вопрос даже о перспективах адъювантов на основе охарактеризованных субстанций хитозана в целом, тем более объективной связи «структура-функция» (ФХХ хитозана и ИА) остается открытым.

Основа борьбы с гриппом, одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения на современном этапе, а также подготовки к следующей пандемии, – своевременная вакцинопрофилактика [7, 59]. Как отмечалось выше, имеющиеся вакцины не лишены ряда ограничений, а один из основных подходов совершенствования – создание новых адъювантов.

Использование вакцин на основе различных штаммов вируса гриппа (человека, животных – птиц и свиней), то есть оценка ИА адъюванта на основе хитозана, с учетом вариабельности антигена – определяет целесообразность использования данной модели в настоящей работе.

Обобщая сказанное выше, представляло несомненный интерес проведение прямых сравнительных исследований ИА набора препаратов на основе охарактеризованных субстанций хитозана и его производных с различными ФХХ при высокой однородности (низком ИП) и чистоте (белок и эндотоксины) на модели инактивированных вакцин против гриппа, вводимых мышам в/м.

В начале настоящих исследований формировался набор охарактеризованных субстанций хитозана для дальнейшего изготовления в контролируемых условиях адъювантов на их основе.

Для обеспечения объективности дальнейших изысканий уже на этом этапе подбирали субстанции с широким диапазоном ФХХ (ММ от 10 до 700 кДа, СД от 30 до 98%) при низком ИМ (не более 2,3), что покрывает основной спектр описанных в литературе препаратов [52] (см. также Табл. 2 и 3). Кроме того, в набор включали субстанции, полученные из того же исходного сырья различными методами, то есть различающиеся только по одной из ключевых ФХХ – с высокой или низкой ММ при одинаковой СД; а также различные по СД при одинаковой ММ (см. Рис. 2), что позволяет в контролируемых условиях оценить влияние именно ММ или СД на ИА.

С использованием оригинального ФП, продуцируемого мицелиальным грибом *Myceliophthora fergussi*, после подбора оптимальных условий деполимеризации была получена субстанция НМ хитозана (10-85). Более того, способ ферментативного гидролиза позволил получить хитозан с заданными ФХХ при низком ИП и содержании остаточного белка и эндотоксинов, что является перспективным направлением получения препаратов с управляемыми свойствами для дальнейших биомедицинских исследований.

Особое внимание уделялось изучению ФХХ субстанций. Так, использовался комплекс методов (см. Табл. 10): вискозиметрии и ВЭЖХ – для определения средневязкостной (M_v); средневесовой (M_w), среднечисленной (M_n) ММ и расчета ИП на их основе, соответственно; КТ, ЯМР, УФ-спектроскопии – для определения СД.

Разработанный нами набор охарактеризованных субстанций и соответствующих адъювантов на основе хитозана сможет найти применение и в других направлениях исследований и разработки иммунобиопрепаратов, а также биомедицинских изделий.

Основная часть диссертации была посвящена изучению ИА препаратов на основе охарактеризованных субстанций хитозана и его производных с различными ФХХ на модели инактивированных вакцин против гриппа человека и животных (серотипы H1N1 и H5N1), при этом оценку ИА проводили через иммуногенность по титрам антител в сыворотке и легких в отношении вакцинных и антигенно отличных штаммов (РЗГА, РН и по уровню IgG в ELISA), а также – защитный эффект (выделение вируса из легких вакцинированных животных после инфекции). Такие исследования проведены впервые.

Полученные данные показали, что адъюванты на основе хитозана с различными ФХХ обладают неодинаковой ИА. Более того, некоторые хитозаны практически не повышали иммуногенность при добавлении к вакцинам. В целом, с повышением, прежде всего, ММ и также СД повышалась и иммуногенность; при этом хитозаны именно с высокой ММ обуславливали высокий защитный эффект вакцины. Любопытно отметить, что повышение ММ приближает хитозана к его природному источнику хитину, тогда как повышение СД, – наоборот.

Следует отметить, что иммуногенность определяется комплексным взаимодействием как минимум 3 существенных факторов: ключевых ФХХ (ММ и СД), а также вакцинного штамма (типа антигена). Обобщенные данные по ММ и антигену представлены в Табл. 13. Необходимо отметить, что вакцины против гриппа свиней (свиного происхождения) были в целом более иммуногенны в сравнении с вакцинами против гриппа птиц и человека (использовалась мышьяная модель).

Таблица 13 – Иммуногенность хитозанов (совокупные данные)

| хитозан (ММ- СД) | прирост иммуногенности (РЗГА, сыворотки, 2-кратная иммунизация), x раз | | |
|------------------------|---|------|-----|
| | SOIV | H5N1 | PR8 |
| 700-85 | 896 | 56 | 13 |
| 10-85 | 128 | 1 | 8 |
| 300-85 | 1024 | 4 | 13 |
| 250-85 | 448 | 14 | 13 |

На основании всех полученных в настоящих исследованиях данных был выбран наиболее перспективный адъювант-кандидат – 700-85 (ММ (Mv) 700 кДа, СД (ЯМР) 85%). Данный адъювант:

- 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.

Следует подчеркнуть, что исходное сырье для получения адъюванта-кандидата – полностью российского происхождения, что позволяет наладить национальное производство препарата полного цикла.

В завершающей части исследований оценивали иммуногенность препаратов на основе хитозана с высокой ММ в сравнении с другими

адьювантами, причем всех основных групп по природе и механизму действия (гидроксид алюминия, CpG, а также экспериментальные эмульсии и суспензии) [20]. В результате было показано, что хитозан как адьювант превосходит гидроксид алюминия и CpG, а также по иммуногенности сравним с суспензией и эмульсией «масло в воде» на основе сквалена, которые разрабатываются как препараты следующего поколения [19].

Что касается особенностей механизмов ИА, то нами показано, что хитозан повышает иммуногенность только при совместном введении с антигеном («в одном шприце»), то есть преимущественно имеет место взаимодействие адьюванта с антигеном (в том числе формирование депо, стабилизация, замедленное высвобождение), а не прямая иммуномодуляция.

Кроме того, решающую роль играет именно положительный заряд (адьювант представляет собой раствор в глутаминовой кислоте при pH 5,01), тем более, что производные хитозана – СХ с различными СЗ практически не повышали, а в некоторых случаях даже понижали иммуногенность вакцины. Данный факт также подтверждается низкой иммуногенностью реацетилированного хитозана (200-30 в сравнении с 200-85).

Необходимо подчеркнуть, что контроль специфических примесей в хитозане – остаточных белков и, в особенности, эндотоксинов (в частности бактериальных липополисахаридов (ЛПС)) позволяет исключить их роль в реализации ИА.

Как отмечалось выше, аналогов проведенного нами исследования нет. Впервые собран набор охарактеризованных субстанций хитозана из которых в контролируемых условиях приготовлены адьюванты и проведены сравнительные исследования с использованием инактивированных вакцин против гриппа.

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 адъюванты как гидроксид алюминия и CpG и не уступали по этому показателю экспериментальным суспензии и эмульсии «масло в воде» на основе сквалена. Кроме того, для реализации ИА хитозана необходимо введение адъюванта совместно с антигеном («в одном шприце»).

Наиболее перспективным адъювантом-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 адъюванты для вакцин.
3. Показано, что иммуноадъювантная 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 адъювантам 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 адъюванта с вакциной (антигеном), то есть «в одном шприце».
6. Разработан перспективный адъювант-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 адьюванты, но и консерванты, а с учетом возможных взаимодействий с белками – и стабилизаторами вакцин.

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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Условные обозначения адъювантов приведены в Табл. 4.

Условные обозначения штаммов вируса гриппа приведены в Табл. 5.

Условные обозначения хитозанов приведены в Табл. 10.

АГА – N-ацетил-2-дезоксид-D-глюкоза (ацетилглюкозамин);

в/м – внутримышечно;

ВМ – высокомолекулярный;

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения;

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

и/н – интраназально;

ИА – иммуноадъювантная активность;

ИД – инфекционная доза;

ИП – индекс полидисперсности;

КТ – кондуктометрическое титрование;

КЭ – куриные эмбрионы;

ЛПС – липополисахариды;

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

НМ – низкомолекулярный;

ОП – оптическая плотность;

ОПк – ОП в контрольной группе неиммунизированных животных;

ОПэ – экспериментальная (опытная) ОП;

п/к – подкожно;

РЗГА – реакция задержки (торможения, ингибирования) гемагглютинации;

РН – реакция нейтрализации;

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

СЗ – степень замещения;

СХ – сукциноил-хитозан;

ТМХ – триметилхитозан;

Ф/С – фермент/субстратное соотношение;

ФП – ферментный препарат;

ФСР – фосфатно-солевой раствор;

ФХХ – физико-химические характеристики;

ЦПД – цитопатогенное действие;

ЭИД – эмбриональная инфекционная доза;

ЯМР – ядерный (протонный) магнитный резонанс;

НА – гемагглютинин;

НА – нейраминидаза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Албулов, А.И.** Хитин и хитозан. Сырьевые источники, основные методы переработки, выпускаемая продукция [Текст] / А.И. Албулов, В.Е. Красавцев, Е.Э. Куприна [и др.] // Хитозан / К.Г. Скрыбин, С.Н. Михайлов, В.П. Варламов – М.: Центр «Биоинженерия» РАН. – 2013. – С. 517-565.
2. **Васильев, Ю.М.** Адъюванты гриппозных вакцин – современное состояние [Текст] / Ю.М. Васильев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 1. – С. 100-110.
3. **Васильев, Ю.М.** Направления совершенствования вакцин против гриппа [Текст] / Ю.М. Васильев // Врач. – 2014. – № 8. – С. 12-14.
4. **Васильев, Ю.М.** Получение инактивированной вакцины против вирусов гриппа птиц [Текст] / Ю.М. Васильев, Ю.З. Гендон // Ветеринария. – 2010. – № 4. – С. 58-61.
5. **Васильева, Т.М.** Получение низкомолекулярных форм хитина и хитозана в электронно-пучковой плазме [Текст] / Т.М. Васильева, С.А. Лопатин, В.П. Варламов // Химия высоких энергий. – 2016. – № 2. – С. 155-159.
6. **Гамзазаде, А.И.** Исследование гидродинамических свойств растворов хитозана [Текст] / А.И. Гамзазаде, В.М. Шлимак, А.М. Скляр [и др.] // Acta Polymerica. – 1985. – № 36. – С. 420-424.
7. **Гендон, Ю.З.** Проблемы профилактики гриппа с помощью вакцин [Текст] / Ю.З. Гендон, Ю.М. Васильев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 4. – С. 115-124.
8. **Гендон, Ю.З.** Гриппозные вакцины [Текст] // Вакцины и вакцинация: национальное руководство / под ред. В.В. Зверева, Б.Ф. Семенова, Р.М. Хаитова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – С. 492-526.

9. **Ильина, А.В.** Деполимеризация высокомолекулярного хитозана ферментным препаратом Целловирин Г20х [Текст] / А.В. Ильина, Ю.В. Ткачева, В.П. Варламов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – № 2. – С. 132-135.
10. **Ильина, А.В.** Определение остаточного белка и эндотоксинов в хитозане (обзор) [Текст] / А.В. Ильина, В.П. Варламов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – №5. – С. 455-459.
11. **Каверин, Н.В.** Ортомиксовирусы (Orthomyxoviridae) [Текст] / Н.В. Каверин, Д.К. Львов // Медицинская вирусология / Д.К. Львов – М.: МИА. – 2008. – С. 176-183.
12. **Каширина, О.С.** Живые аттенуированные и инактивированные гриппозные вакцины: данные прямых сравнительных исследований [Текст] / О.С. Каширина, Ю.М. Васильев // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии. – 2014. – № 1. – С. 103-119.
13. **Колобухина, Л.В.** Грипп [Текст] / Л.В. Колобухина, Д.К. Львов, Е.И. Бурцева // Медицинская вирусология / Д.К. Львов – М.: МИА. – 2008. – С. 382-393.
14. **Лопатин, С.А.** Проблемы определения молекулярно-массовых характеристик хитозана [Текст] / С.А. Лопатин // Рыбпром. Технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов. – 2010. – № 2. – С. 82-85.
15. **Мелентьев, А.И.** Ферменты деградации хитина и хитозана [Текст] / А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов // Хитозан / К.Г. Скрябин, С.Н. Михайлов, В.П. Варламов – М.: Центр «Биоинженерия» РАН. – 2013. – С. 71-114.
16. **Михайлов, С.Н.** Хитозан - биополимер с уникальными свойствами [Текст] / С.Н. Михайлов, В.П. Варламов // Хитозан / К.Г. Скрябин, С.Н. Михайлов, В.П. Варламов – М.: Центр «Биоинженерия» РАН. – 2013. – С. 5-17.

17. **Новиков, В.Ю.** Кинетические закономерности химического дезацетилирования хитина и хитозана / В.Ю. Новиков, Е.Н. Чеботок, Г.А. Гизатулина [и др.] // Вестник МГТУ. – 2005. – №1. – С. 179-182.
18. **Переверзев, А.Д.** Факторы, влияющие на адъювантные свойства производных хитозана, при парентеральном введении инактивированных гриппозных вакцин [Текст] / А.Д. Переверзев, С.М. Шинкарев, С.Г. Маркушин [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2012. – № 4. – С. 80-86.
19. **Черникова, М.И.** Сравнительное изучение иммуногенности адъювантов различной природы и механизма действия на модели инактивированной вакцины против гриппа [Текст] / М.И. Черникова, О.С. Каширина, Ю.М. Васильев // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии. – 2015. – № 6. – С. 63-71.
20. **Черникова, М.И.** Вакцины против гриппа с иммуноадъювантами: данные прямых сравнительных исследований [Текст] / М.И. Черникова, Ю.М. Васильев // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии. – 2015. – № 5. – С. 88-102.
21. **Шагдарова, Б.Ц.** Получение низкомолекулярного хитозана и его производных [Текст] / Б.Ц. Шагдарова, А.Н. Левов, В.П. Варламов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2013. – № 3 - С. 1694-1969.
22. **Aranaz, I.** Functional characterization of chitin and chitosan [Text] / I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris [et al.] // Current Chemical Biology. – 2009. – Vol. 3. – P. 203-230.
23. **Atmar, R.** Norovirus vaccine against experimental human norwalk virus illness [Text] / R. Atmar, D. Bernstein, C. Harro [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2011. – Vol. 365. – P. 2178-87.

24. **Bertram, U.** In situ gelling nasal inserts for influenza vaccine delivery [Text] / U. Bertram, M. Bernard, J. Haensler [et al.] // Drug Development and Industrial Pharmacy. – 2010. – Vol. 36 – P. 581-593.
25. **Dash, M.** Chitosan – a versatile semisynthetic polymer in biomedical applications [Text] / M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite [et al.] // Progress in Polymer Science. – 2011. – Vol. 36. – P. 981-1014.
26. **de Geus, E.** A lack of antibody formation against inactivated influenza virus after aerosol vaccination in presence or absence of adjuvantia [Text] / E. de Geus, D. van Haarlem, O. Poetri [et al.] // Veterinary Immunology and Immunopathology. – 2011. – Vol. 143. – P. 143-147.
27. **Ghendon, Y.** Evaluation of Properties of Chitosan as an Adjuvant for Inactivated Influenza Vaccines Administered Parenterally [Text] / Y. Ghendon, S. Markushin, Y. Vasiliev [et al.] // Journal of Medical Virology. – 2009. – Vol. 81. – P. 494-506.
28. **Heffernan, M.J.** In vivo efficacy of a chitosan/IL-12 adjuvant system for protein-based vaccines [Text] / M.J. Heffernan, D.A. Zaharoff, J.K. Fallon [et al.] // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32. – P. 926-932.
29. **Hirai, A.** Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy [Text] / A. Hirai, H. Odani, A. Nakajima // Polymer Bulletin. – 1991. – Vol. 26. – P. 87-94.
30. **Jean, M.** Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies [Text] / M. Jean, F. Smaoui, M. Lavertu [et al.] // Gene Therapy. – 2009. – Vol. 16. – 1097-1110.
31. **Jia, Z.H.** Effect of reaction temperature and using reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid [Text] / Z.H. Jia, D.F. Shen // Carbohydrate Polymers. – 2002. – Vol. 49. – P. 393-396.

32. **Knill, C.J.** Acid hydrolysis of commercial chitosans [Text] / C.J. Knill, J.F. Kennedy, J. Mistry [et al.] // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2005. – Vol. 80. – P. 1291-1296.
33. **Lee, D.X.** Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase [Text] / D.X. Lee, W.S. Xia, J.L. Zhang // Food Chemistry. – 2008. – Vol. 111. – P. 291-295.
34. **Lieder, R.** Endotoxins affect bioactivity of chitosan derivatives in cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells [Text] / Lieder R., Gaware V.S., Thormodsson F. [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2013. – Vol. 9. – P. 4771-4778.
35. **Lin, S.B.** // Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: characterisation and antibacterial activity [Text] / S.B. Lin, Y.C. Lin, H.H. Chen // Food Chemistry. – 2009. – Vol. 116. – P. 47-53.
36. **Mann, A.** Intranasal H5N1 vaccines, adjuvanted with chitosan derivatives, protect ferrets against highly pathogenic influenza intranasal and intratracheal challenge [Text] / A. Mann, N. Noulin, A. Catchpole [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – e93761.
37. **McNeela, E.A.** A mucosal vaccine against diphtheria: formulation of cross reacting material (CRM197) of diphtheria toxin with chitosan enhances local and systemic antibody and Th2 responses following nasal delivery [Text] / E.A. McNeela, D. O'Connor, I. Jabbal-Gill [et al.] // Vaccine. – 2000. – Vol. 19. – P. 1188-1198.
38. **McNeela, E.A.** Intranasal immunization with genetically detoxified diphtheria toxin induces T cell responses in humans: enhancement of Th2 responses and toxin-neutralizing antibodies by formulation with chitosan [Text] / E.A. McNeela, I. Jabbal-Gill, L. Illum [et al.] // Vaccine. – 2004. – Vol. 22. – P. 909-914.
39. **Miller, G.L.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars [Text] / G.L. Miller // Analytical Chemistry. – 1959. – V. 31. – P. 426-428.

40. **Mourya, V.K.** Chitooligosaccharides: Synthesis, Characterization and Applications [Text] / V.K. Mourya, N.N. Inamdar, Y.M. Choudhari // Polymer Science. – 2011. – Vol. 53. – N. 7. – P. 583-612.
41. **Nishimura, K.** Immunological activity of chitin and its derivatives [Text] / K. Nishimura, S. Nishimura, N. Nishi [et al.] // Vaccine. – 1984. – Vol. 2. – P. 93-99.
42. **Palache, A.** Survey of distribution of seasonal influenza vaccine doses in 201 countries (2004-2015): The 2003 World Health Assembly resolution on seasonal influenza vaccination coverage and the 2009 influenza pandemic have had very little impact on improving influenza control and pandemic preparedness [Text] / A. Palache, A. Abelin, R. Hollingsworth [et al.] // Vaccine. – 2017. – Vol. 35. – P. 4681-4686.
43. **Palese, P.** Orthomyxoviridae: the viruses and their replication / P. Palese, M.L. Shaw, D.M. Knipe [et al.] // In D.M. Knipe et al. eds. Fields Virology. 5th ed. – 2007. – Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins. – P. 1647-1690.
44. **Pan, A.D.** Enzymolysis of chitosan by papain and its kinetics [Text] / Pan A.D., H.Y. Zeng, G. Bi. Foua [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2016. – Vol. 135. – P. 199-206.
45. **Rathore, A.S.** Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives [Text] / A.S. Rathore, R.D. Gupta // Enzyme Research. – 2015. – Vol. 2015. – 791907.
46. **Read, R.** Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan [Text] / R. Read, S. Naylor, C. Potter [et al.] // Vaccine. – 2005. – Vol. 23. – P. 4367-4374.
47. **Rekha, M.R.** pH sensitive succinyl chitosan microparticles: a preliminary investigation towards oral insulin delivery [Text] / M.R. Rekha, Chandra P. Sharma // Trends in Biomaterials and Artificial Organs. – 2008. – Vol. 21. – P. 107-115.

48. **Scherließ, R.** In vivo evaluation of chitosan as an adjuvant in subcutaneous vaccine formulations [Text] / R. Scherließ, S. Buske, K. Young [et al.] // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31. – P. 4812-4819.
49. **Sharma, S.** Enhanced immune response against pertussis toxoid by IgA-loaded chitosan-dextran sulfate nanoparticles [Text] / S. Sharma, T.K. Mukkur, H.A. Benson [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2012. – Vol. 101. – P. 233-244.
50. **Tan, S.** The degree of deacetylation of chitosan: Advocating the first derivative UV spectrophotometry method of determination [Text] / S. Tan, E. Khor, T. Tan [et al.] // *Talanta*. – 1998. – Vol. 45. – P. 713-719.
51. **Tregoning, J.S.** Adjuvanted influenza vaccines [Text] / J.S. Tregoning, R.F. Russell, E. Kinnear // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2018. – Vol. 14. – P.550-564.
52. **Vasiliev, Y.** Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation [Text] / Y. Vasiliev // *Expert Review of Vaccines*. – 2015. – Vol. 1. – P. 37 - 53.
53. **Verheul, R.J.** A step-by-step approach to study the influence of N-acetylation on the adjuvanticity of N,N,N-trimethyl chitosan (TMC) in an intranasal nanoparticulate influenza virus vaccine [Text] / R. Verheul, N. Hagens, T. van Es [et al.] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2012. – Vol. 45. – P. 467-474.
54. **Wang, W.** Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation [Text] / W. Wang, S. Bo, S. Li [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 1991. – Vol. 13. – P. 281-285.

55. **Westerink M.A.** ProJuvant (Pluronic F127/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid [Text] / M.A. Westerink, S.L. Smithson, N. Srivastava [et al.] // *Vaccine*. – 2002. – Vol. 20. – P. 711-723.
56. **WHO.** Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza [Text]. – 2011. – 153 p.
57. **WHO.** Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019-2020 northern hemisphere influenza season [Text] // *Weekly Epidemiological Record*. – 2019. – Vol. 94. – P. 141-150.
58. **WHO.** Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019 southern hemisphere influenza season [Text] // *Weekly Epidemiological Record*. – 2019. – Vol. 93. – P. 553-562.
59. **WHO.** Vaccines against influenza WHO position paper [Text] // *Weekly Epidemiological Record*. – 2012. – Vol. 87. – P. 461-476.
60. **WHO.** Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness [Text] // *Weekly Epidemiological Record*. – 2019. – Vol. 94. – P. 151-160.
61. **Wright, P.** Orthomyxoviruses [Text] / P. Wright, G. Neumann, Y. Kawaoka // In D.M. Knipe et al. eds. *Fields Virology*. 5th ed. – 2007. – Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins. – P. 1692-1740.
62. **Xia, W.** Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases [Text] / W. Xia, P. Liu, J. Liu // *Bioresource Technology*. – 2008. – Vol. 99. – P. 6751-6762.
63. **Zhao, K.** Preparation and immunological effectiveness of a swine influenza DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles [Text] / K. Zhao, X. Shi, Y. Zhao [et al.] // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29. – P. 8549-8556.