

ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АДЬЮВАНТА НА ОСНОВЕ ФЛАГЕЛЛИНА

© 2024 О.О. Сокол¹, Н.А. Никитин^{2*}, Е.А. Евтушенко², О.В. Карпова²,
И.Н. Матвеева^{1,3}, С.А. Гринь¹, В.М. Попова¹, И.В. Иванов¹, Ю.Н. Федоров¹,
И.Ю. Литенкова³

¹ Всероссийский научно-исследовательский
и технологический институт биологической промышленности,
141142 пос. Биокомбината, городской округ Лосино-Петровский, Московская область, Россия
² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: nikitin@mail.bio.msu.ru
³ Щелковский биокомбинат,
141142 пос. Биокомбината, городской округ Лосино-Петровский, Московская область, Россия

Поступила в редакцию 06.10.2023

После доработки 19.01.2024

Принята к публикации 01.03.2024

Бешенство является зоонозным заболеванием с высокой степенью летальности. Большинство случаев смерти людей связаны с укусами, полученными от собак и кошек. Вакцинация является наиболее эффективным методом профилактики заболевания бешенством как у животных, так и у людей. В этом исследовании оценивалась способность адьюванта на основе рекомбинантного флагеллина *Salmonella typhimurium* повышать протективную активность инактивированной вакцины против бешенства у мышей. Для этого использовали серию инактивированной сухой культуральной вакцины для собак и кошек «Рабикан» (штамм «Щелково-51») с добавлением адьюванта в различных разведениях. Контрольным препаратом служила аналогичная серия инактивированной сухой культуральной вакцины без адьюванта. Протективную активность вакцинных препаратов оценивали методом NIH (NIH potency test), который является наиболее широко используемым и рекомендованным на международном уровне методом определения эффективности для тестирования инактивированных вакцин против бешенства. Значение специфической активности испытуемой антирабической вакцины при совместном введении с адьювантом было значительно выше (48,69 МЕ/мл), чем у вакцины без адьюванта (3,75 МЕ/мл). Таким образом, рекомбинантный флагеллин можно рассматривать в качестве эффективного адьюванта в составе будущих вакцинных препаратов против вируса бешенства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бешенство, инактивированная вакцина, адьювант, флагеллин, специфическая активность, метод NIH.

DOI: 10.31857/S0320972524030103 EDN: WJUFNH

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство – чрезвычайно опасное вирусное заболевание млекопитающих и человека, характеризующееся поражением центральной нервной системы с неизбежным смертельным исходом. Для борьбы с этим заболеванием используются антирабические вакцины, которые при введении животным должны обеспечить формирование напряженного и длительного иммунитета [1]. Одним из наиболее важных показателей эффек-

тивности любого вакцинного препарата является специфическая активность, которая оценивается на целевых животных. Учитывая особенности инфекции и сложности с учетом результатов контроля, для определения протективной активности антирабических вакцин *in vivo* на мышах используется классический метод, предложенный Национальным институтом здравоохранения США (National Institutes of Health test, NIH), рекомендуемый международными регулирующими органами OIE (Всемирная организация по охране здоровья животных) и Европейской фармакопеей [2–3], в том числе отечественными стандартами

* Адресат для корреспонденции.

(ФС.3.3.1.0025.15; ГОСТ Р 55283-2012). Данный тест был разработан в США в 1953 г. и применяется в неизменном виде по настоящее время практически всеми производственными и контрольными лабораториями во всех странах [4].

Совершенствование существующих инактивированных вакцин и разработка современных субъединичных и ДНК-вакцин потребовали исследований, направленных на поиск и конструирование принципиально новых безопасных и эффективных адъювантов, способных повышать поствакцинальный иммунный ответ на вирусные патогены [5–12]. Также необходимы исследования действия различных адъювантов с целью совершенствования имеющихся в настоящее время вакцин в направлении снижения затрат и/или повышения их эффективности, оптимизации дозы вакцины при одновременном повышении иммуногенности и уменьшения количества призывов [13].

Предполагается, что основные причины недостаточной эффективности инактивированных вакцин против бешенства заключаются в их ограниченной способности вызывать формирование длительного и напряженного клеточного иммунитета, стойкой иммунологической памяти, что требует необходимости в повторной вакцинации инфицированных животных [14]. В связи с этим разработка подходов к повышению эффективности вакцин против бешенства является актуальной, и одним из способов решения такой задачи может быть использование различных адъювантов. Некоторые активно исследуемые адъюванты могут индуцировать ответ системы врожденного иммунитета путем регуляции экспрессии антигенов гистосовместимости (МНС), активировать антигенпрезентирующие клетки (АПК) с помощью рецепторов распознавания молекулярных паттернов возбудителей (PRR), что приводит к развитию локального воспаления и последующему эффективному запуску адаптивных иммунных реакций [15]. Одним из таких адъювантов, широко используемых в современных исследованиях, является флагеллин, способный индуцировать усиленный антигенспецифический иммунный ответ [16–18]. Целью настоящего исследования являлось изучение протективных свойств рекомбинантного флагеллина RecFlic-FM из *Salmonella typhimurium* как адъюванта в составе инактивированной вакцины против бешенства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы и вакцины. Референтный штамм вируса бешенства «CVS» (Challenge Virus Standard) был предоставлен референтным центром по

бешенству OIE Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife ANSES (Франция).

В работе использовали антирабическую инактивированную сухую культуральную вакцину для собак и кошек «Рабикан» (из штамма «Щелково-51») производства ФКП «Щелковский биокombинат» (серия 1020, 12.01.2021 г.) и национальную стандартную (референс-) вакцину, имеющую специфическую активность, равную 5,2 МЕ/мл: отраслевой стандартный образец антирабической вакцины (СТО-00494189-0042-2010 ФКП «Щелковский биокombинат»). Референс-вакцина откалибрована по международному стандарту, и оценка ее эффективности (МЕ/мл) проведена с использованием теста НИИ [2], в сравнении с партией международного биологического эталонного препарата (BRP) №5 [19], предоставленной Европейским директором по качеству лекарств, как описано в монографии Европейской фармакопеи [20].

Антирабическая инактивированная сухая культуральная вакцина для собак и кошек из штамма «Щелково-51» представляет собой инактивированный β -пропиолактоном вирус бешенства штамма «Щелково-51», лиофилизированный в защитной среде с добавлением 33,3% сахароза-пептон-желатинового стабилизатора. Специфическая активность – 3,7 МЕ/мл.

Адъювант. Рекомбинантный флагеллин из *S. typhimurium* (RecFlic-FM) любезно предоставлен ООО «Фирн М» (пос. Оболенское, Россия). Это рекомбинантный белок флагеллина, кодируемый геном *fliC* из грамотрицательных бактерий *S. typhimurium*. Рекомбинантный флагеллин наработан в клетках *Escherichia coli* и очищен с применением аффинной хроматографии, как описано ранее [21] (производственная серия №5 от 15.02.2021 г. («Фирн М», Россия)).

Для получения вакцинного кандидата к 20 мкг адъюванта «RecFlic-FM» добавляли простым смешиванием 1 мл инактивированной культуральной вакцины против бешенства штамма «Щелково-51» для собак и кошек.

Электронная микроскопия. Образцы для электронной микроскопии были приготовлены согласно стандартной процедуре [22] с помощью 2%-ного водного раствора уранилацетата в качестве контрастирующего агента. Микрофотографии были получены с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-1400 («JEOL», Япония) с ускоряющим напряжением 80 кВ. Анализ размеров частиц проводили с помощью программного обеспечения ImageJ (НИИ, США).

Животные. В экспериментах использовали самцов мышей Balb/c массой 13–15 г, возрастом не менее 3 недель (всего в экспериментах участвовало 280 животных). Мышей обеспечивали кормом и водой неограниченно и содержали группами

по 8 животных. За всеми животными проводили ежедневное наблюдение на протяжении всего периода эксперимента.

Все эксперименты *in vivo* проводили в соответствии с регламентом 2010/63/CE Европейского парламента и Совета ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, руководством по уходу и использованию лабораторных животных и в соответствии с Этическим кодексом российского ветеринара, рекомендованным на XIII Московском международном ветеринарном конгрессе Российской ассоциации ветеринаров мелких животных в апреле 2005 г. (Москва, Россия) [3]. Все эксперименты были одобрены комитетом по этике ФГБНУ ВНИТИБП, № 10-01 от 13.11.2021 г.

Оценка заражающей дозы вируса бешенства. Оценку титра стандарта вируса осуществляли после внутримозгового заражения 4-х групп мышей (по 10 животных в каждой группе): по 0,03 мл штамма вируса бешенства «CVS» (рабочее разведение) – мышам первой группы, а далее 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000. Титр вируса рассчитывали по методу Reed и Muench [23] и выражали в lg ЛД₅₀/мл.

Метод НИИ. Эталонную вакцину (Национальная антирабическая референс-вакцина, СТО-00494189-0042-2010, специфическая активность – 5,2 МЕ/мл), вакцину «Рабикан» и вакцинные кандидаты, содержащие адъювант, последовательно разбавляли PBS до 1 : 5, 1 : 25, 1 : 125, 1 : 625, 1 : 3125, согласно стандартному протоколу [24]. Все препараты вводили внутрибрюшинно 16 мышам дважды с интервалом в 7 дней. Через 7 дней после последней иммунизации мышам вводили вирус бешенства «CVS» 5–50 ЛД₅₀ в дозе 0,03 мл и вели наблюдение в течение 14 дней. Учитывали случаи смерти мышей через 5 и 14 дней после заражения.

Случаи гибели мышей от бешенства в течение экспериментального периода регистрировали как специфические обнаружением в мазках-отпечатках головного мозга яркого зеленого свечения в реакции иммунофлуоресценции.

Расчет 50%-ной эффективной дозы (ЭД₅₀, 50%-ное конечное разведение) вакцины проводили по методу Спирмена–Кербера в модификации Ашмарина–Воробьева [25]. Для расчета специфической активности использовали следующую формулу:

$$\text{Специфическая активность} = A/B \times Y,$$

где А – обратная величины 50%-ного конечного разведения испытуемой вакцины; В – обратная величина 50%-ного конечного разведения референс-вакцины; Y – специфическая активность национальной референс-вакцины (5,2 МЕ/мл).

Реакция иммунофлуоресценции. Обнаружение антигенов бешенства в головном мозге

мышей проводили путем постановки реакции прямой иммунофлуоресценции, как описано ранее [26, 27]. Кратко, по 5 мазков для каждой погибшей мыши готовили из объединенного образца ткани головного мозга животных. Оттиски сушили при комнатной температуре и фиксировали в холодном ацетоне при –20 °С в течение 30 мин. Затем предметные стекла сушили на воздухе, и каждый оттиск окрашивали, добавляя 50 мкл поликлональных антител к нуклеокапсиду вируса бешенства, конъюгированных с флуоресцеин изотиоцианатом (#357-2112; «Biorad», Франция), в течение 30 мин при 37 °С в камере с высокой влажностью. Предметные стекла изучали при увеличении 200× с помощью флуоресцентного микроскопа «Olympus IX51» («Olympus», Япония), оборудованного цифровой цветной камерой CMOS 5 Мпикс и адаптером 0,35 C-mount («TourTek», Китай).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки возможности повышения протективной активности коммерческой инактивированной вакцины против вируса бешенства использовали рекомбинантный флагеллин из *S. typhimurium* RecFlic-FM. Результаты оценки подлинности и чистоты препарата с помощью электрофореза в 13%-ном ДСН-ПААГ представлены на рис. 1.

Анализ рекомбинантного флагеллина RecFlic-FM методом электрофореза подтвердил подлинность (51 кДа) и чистоту используемого в исследованиях адъюванта. Микроскопический анализ препарата флагеллина продемонстрировал наличие протяженных нитей диаметром около 18 нм.

Для оценки титра штамма вируса бешенства «CVS», используемого в дальнейших экспериментах по заражению животных, согласно протоколу НИИ, вирус титровали на мышах за день до начала эксперимента по оценке протективной активности кандидатной вакцины [28] (рис. 2). Почти все мыши в группах, где применили для заражения вирус в рабочем разведении и 1 : 10, погибли. Установлено, что титр вируса бешенства «CVS» составил 40 ЛД₅₀/0,03 мл и обеспечивал гибель мышей от бешенства (табл. 1), что достаточно для определения протективности вакцинного препарата [2].

Согласно протоколу НИИ, мыши, павшие в срок до 5 дней после контрольного заражения, регистрируются как неспецифические последствия (не в результате инфекции вирусом бешенства), о чем свидетельствовало отсутствие яркого зеленого свечения в мазках-отпечатках головного мозга мышей в реакции иммунофлуоресценции (рис. П1 в Приложении). Такие мыши исключаются

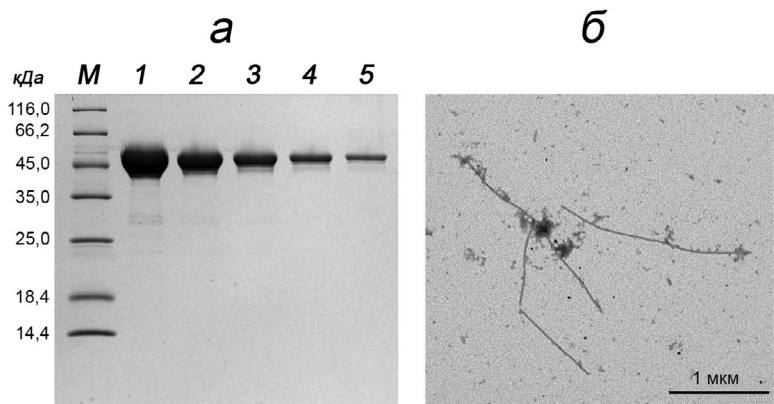


Рис. 1. Анализ препарата рекомбинантного флагеллина RecFlic-FM. *а* – Электрофоретический анализ в 13%-ном ДСН-ПААГ, окрашивание в Кумасси G-250; дорожки: *М* – маркеры молекулярной массы белков, кДа («Thermo Fisher Scientific», США), 1–5 – RecFlic-FM в концентрации 1, 0,5, 0,25, 0,1 и 0,05 мг/мл соответственно. *б* – Просвечивающая электронная микроскопия, контрастирование 2%-ным водным раствором уранилацетата; размер метки – 1 мкм

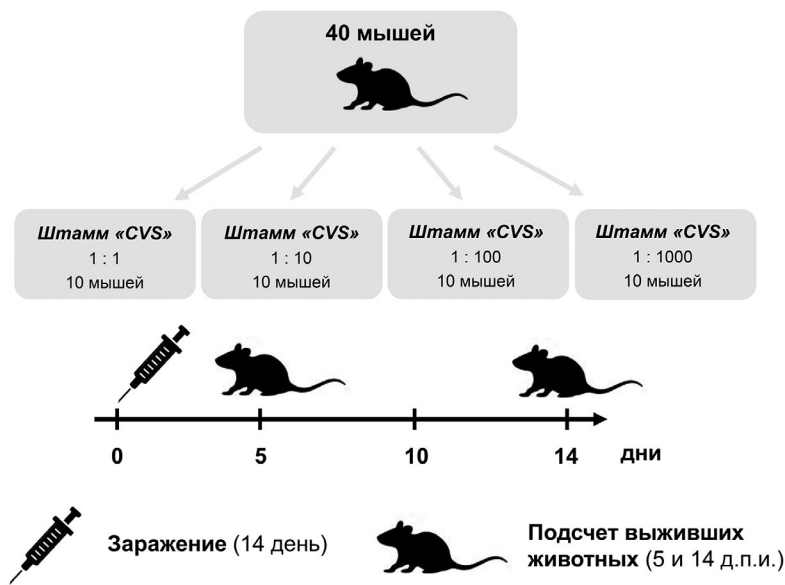


Рис. 2. Схематическое изображение эксперимента по оценке титра ЛД₅₀ вируса бешенства штамма «CVS»

Таблица 1. Определение титра вируса бешенства штамма «CVS»

Количество мышей	Разведение	Доза вируса (мл), интрацеребрально	Количество погибших мышей		lg титра ЛД ₅₀ /0,03 мл
			на 5 д.п.и.	на 14 д.п.и.	
10	1 : 1	0,03	1	8	1,6
10	1 : 10		0	9	
10	1 : 100		0	2	
10	1 : 1000		1	1	

Примечание. д.п.и. – день после инфекции.

при оценке эффективности вакцинных композиций (ЭД₅₀ и специфической активности (МЕ/мл)). Для получения вакцинных кандидатов использовали серию инаktivированной культу-

ральной вакцины против бешенства штамма «Щелково-51» с добавлением нового адъюванта «RecFlic-FM» – 20 мкг на дозу вакцины. Контрольным препаратом служила коммерческая инакти-

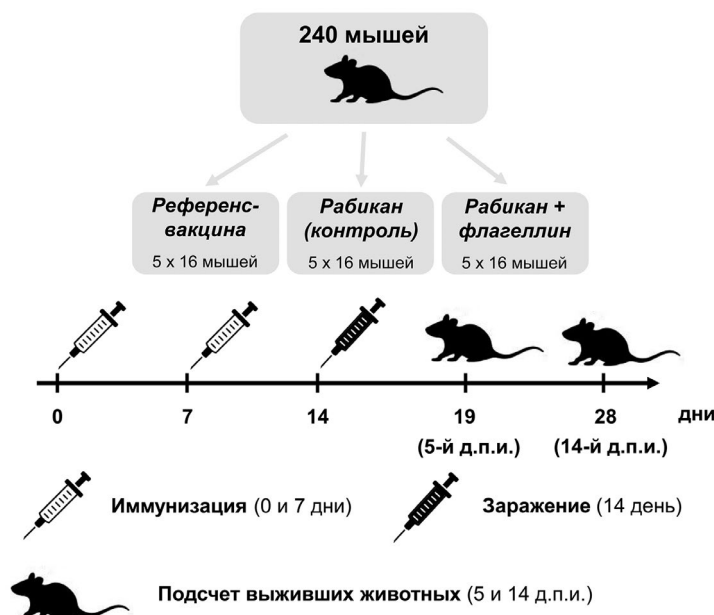


Рис. 3. Схематическое изображение эксперимента по оценке протективной активности инактивированной вакцины против вируса бешенства, содержащей флагеллин в качестве адъюванта; д.п.и. – день после инфекции

вированная сухая культуральная вакцина для собак и кошек «Рабикан» (штамм «Щелково-51») без адъюванта (рис. 3).

Используя данные анализа протективной активности вакцинного кандидата, была построена диаграмма, демонстрирующая соотношение процента выживших иммунизированных животных после заражения вирусом бешенства «CVS» в зависимости от разведения вакцинных препаратов (рис. П1 в Приложении). Как видно из рис. П1, начиная с разведения 1 : 625, выживаемость в группе, иммунизированной инактивированной антирабической вакциной «Рабикан», сопоставима с выживаемостью в группе, иммунизированной Национальной референс-вакциной. В то же время вакцинный кандидат, состоящий из инактивированной вакцины в смеси с адъювантом RecFlic-FM, уже начиная с разведения 1 : 25, демонстрирует более высокий процент выживших животных на 14 день после заражения.

ЭД₅₀ для референс-вакцины и вакцины «Рабикан» было определено путем экстраполяции по методу Спирмена–Кербера в модификации Ашмарина–Воробьева [25]. В случае группы «Рабикан» + RecFlic-FM (20 мкг/доза) в применении методов экстраполяции не было необходимости, так как 50% животных умерло при разведении 1 : 3125; соответственно, это разведение и является ЭД₅₀ для данного вакцинного кандидата (табл. 2; рис. П1 в Приложении).

Анализ специфической активности методом НИН показал, что флагеллин повышает протективные свойства российской антирабической вакцины «Рабикан», состоящей из инактивированных

вирионов бешенства. Показано, что добавление флагеллина к препарату «Рабикан» приводит к возрастанию специфической активности в 13 раз.

Для подтверждения причины гибели мышей от бешенства, начиная с пятого дня после инфекции, применяли тест с использованием специфических диагностических иммуноглобулинов IgG, конъюгированных с флуоресцеин изотиоцианатом (реакция прямой иммунофлуоресценции). Для этого изучали патологический материал мозга, собранный от мышей, зараженных суспензией вируса бешенства штамма «CVS» ($n = 100$), и от иммунизированных мышей всех экспериментальных групп, павших после контрольного заражения ($n = 275$) (рис. СП2–П5 в Приложении). На основании полученных данных было подтверждено, что все смерти были результатом инфекции вирусом бешенства.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Успех борьбы с бешенством в эндемичных регионах возможен при условии наличия эффективной вакцины и своевременной диагностики. Оценка эффективности антирабических препаратов является предметом многолетних исследований, выбор единого метода для контроля разных типов антирабических вакцин остается актуальной проблемой. Более полувека решающая роль в оценке протективности и безопасности вакцин была отведена методам *in vivo*, которые наиболее прямым и надежным способом демонстрировали способность тестовых вакцин защищать животных [29].

Таблица 2. Анализ протективной активности вакцинных препаратов против вируса бешенства методом NIN

Вакцина/адъювант	Объем пробы (мл)	Разведение вакцины	Количество мышей			ЭД ₅₀	Специфическая активность (МЕ/мл)
			Всего	Выжили на 5 д.п.и.	Выжили на 14 д.п.и.		
Национальная референс-вакцина	0,5	1 : 5	16	15	15	1 : 334	5,2
		1 : 25	16	14	12		
		1 : 125	16	15	8		
		1 : 625	16	14	6		
		1 : 3125	16	14	4		
Вакцина «Рабикан» (контроль)	0,5	1 : 5	16	15	12	1 : 241	3,75
		1 : 25	16	15	10		
		1 : 125	16	16	12		
		1 : 625	16	15	6		
		1 : 3125	16	14	4		
«Рабикан» + RecFlic-FM (20 мкг/доза)	0,5	1 : 5	16	14	14	1 : 3125	48,69
		1 : 25	16	16	16		
		1 : 125	16	13	11		
		1 : 625	16	14	9		
		1 : 3125	16	14	7		

Примечание. д.п.и. – день после инфекции.

Однако тестирование каждой производственной партии вакцины против бешенства на предполагаемых целевых видах требует значительных затрат и методических решений.

Разработанный в 1953 г. тест Национального института здоровья (НИН) был рекомендован на международном уровне и широко применялся для серийного тестирования инактивированных антирабических вакцин во всем мире. Учитывая смертельную опасность бешенства для человека, ВОЗ и Европейская фармакопея по-прежнему требуют проведения теста NIN для оценки эффективности инактивированных вакцин, несмотря на некоторые недостатки: применение инфекционного вируса бешенства для заражения; требование технических навыков и строгих мер биобезопасности, а также продолжительность испытания [20].

До настоящего времени ведется интенсивный поиск безопасного, эффективного адъюванта для вакцин против бешенства. Гидроксид алюминия, как часто применяемый адъювант, усиливает гуморальный ответ к вакцине против бешенства, но задерживает раннюю выработку антител, что неблагоприятно для профилактики бешенства [30]. Также выявленные эффекты по снижению стабильности антигенов и высокой реактогенности

приводят к отказам от использования соединений на основе алюминия в качестве компонентов вакцин [31–33]. Однако, например, в Китае с 2005 г. уже введен запрет на использование гидроксида алюминия в качестве адъюванта для вакцины против бешенства у людей [34]. В составе инактивированной антирабической вакцины КОКАВ («Микроген», Россия) продемонстрирован иммуноадъювантный эффект таких рекомбинантных цитокинов, как интерлейкин-1β и фактор некроза опухоли-α. При этом развитие иммунного ответа сопровождалось формированием высокого уровня вируснейтрализующих антител [35]. В другом исследовании было показано, что адъювант РІКА в составе антирабической вакцины действовал через Толл-подобный рецептор 3 (TLR-3) и другие клеточные пути, усиливая презентацию антигена антигенпрезентирующими клетками и индуцируя выработку провоспалительных цитокинов [36]. В качестве адъюванта для инактивированной вакцины против бешенства были также использованы структурно модифицированные вирусы растений, эффективность которых была также исследована методом NIN и была сопоставима с неполным адъювантом Фрейнда [37].

Флагеллин обладает потенциалом для применения в качестве вакцинного адъюванта [38].

Флагеллин распознается поверхностно локализованными Toll-подобными рецепторами пятого типа (TLR-5), экспрессируемыми на дендритных клетках, моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, лимфоцитах, NK-клетках, эпителиальных клетках и стромальных клетках лимфатических узлов. Активация этих типов клеток флагеллином или вакцинами на основе флагеллина приводит к индукции цитокинов и хемокинов, которые способствуют активному привлечению Т- и В-лимфоцитов в дренирующие клетки лимфатических узлов и, таким образом, увеличивает шансы антигенспецифичных лимфоцитов столкнуться с антигенами [39]. В ряде исследований показано, что флагеллин может действовать как эффективный адъювант в вакцинах против гриппа и вируса лихорадки Западного Нила [40–42]. Предпринимались попытки оценить адъювантные свойства флагеллина при применении в составе вакцины против бешенства, однако анализ эффективности такой комбинации методом НИН не проводился. Тем не менее авторы отметили перспективность использования флагеллина при разработке эффективных вакцин против бешенства [43]. В частности, были изучены иммуoadъювантные свойства трех рекомбинантных белков на основе флагеллина из *S. typhimurium* (FljB, FliC и FljB'-FliC) в композиции с инактивированной цельновирионной вакциной против бешенства (WKRВ). В экспериментах на мышах линии BALB/c адъювант FljB вызывал более сильные гуморальные и клеточные иммунные реакции по сравнению с WKRВ в отдельности или в композиции с FliC или FljB'-FliC [43].

В данной работе мы оценивали способность рекомбинантного флагеллина в составе инактивированной вакцины стимулировать иммунный ответ *in vivo*. Оценивая полученные результаты, можно сделать заключение о том, что инактивированная вакцина, содержащая рекомбинантный флагеллин, может быть использована в качестве эффективного препарата для вакцинации против вируса бешенства животных, поскольку обладает

более высокой протективной активностью в сравнении с используемыми вакцинами. Такая вакцина может быть дополнительно разведена или может быть использована в меньшей дозе для достижения минимальной эффективности, необходимой для вакцинации животных (до 2 МЕ/мл), что позволит проводить вакцинацию с меньшими затратами.

Полученные результаты подтверждают возможность получения эффективной инактивированной вакцины против бешенства при применении адъюванта на основе рекомбинантного флагеллина, а также показывают перспективность последнего по использованию в составе вакцин, направленных против других патогенов.

Вклад авторов. И.Н. Матвеева, И.Ю. Литенкова – концепция и руководство работой; О.О. Сокол, Н.А. Никитин, И.Н. Матвеева, С.А. Гринь, В.М. Попова, И.В. Иванов, Ю.Н. Федоров, И.Ю. Литенкова – проведение экспериментов; О.О. Сокол, Н.А. Никитин, О.В. Карпова, И.Н. Матвеева, С.А. Гринь, В.М. Попова, И.В. Иванов, Ю.Н. Федоров, И.Ю. Литенкова – обсуждение результатов исследования; О.О. Сокол, Н.А. Никитин, Е.А. Евтушенко, И.Н. Матвеева – написание текста; Н.А. Никитин, Е.А. Евтушенко, О.В. Карпова, И.Н. Матвеева – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. (грант № 075–15–2021-1054).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Natesan, K., Isloor, S., Vinayagamurthy, B., Ramakrishnaiah, S., Doddamane, R., and Fooks, A. R. (2023) Developments in rabies vaccines: the path traversed from Pasteur to the modern era of immunization, *Vaccines*, **11**, 756, <https://doi.org/10.3390/vaccines11040756>.
2. Wilbur, L. A., and Aubert, M. F. A. (1996) The NIH test for potency, in *Laboratory Techniques in Rabies*, 4th Edn (Meslin F. X., Kaplan M. M., and Koprowski, H., ed) Geneva, Switzerland: World Health Organisation, 360-368.
3. Matveeva, I., Karpova, O., Nikitin, N., Akilin, O., Yelnikov, V., Litenkova, I., Melnik, R., Melnik, N., Asimov, K., Zaberezhny, A., Fyodorov, Y., and Markova, E. (2022) Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against reindeer rabies, *Front. Microbiol.*, **13**, 988738, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.988738>.
4. Nedosekov, V., Polupan, I., and Slivko, I. (2019) Veterinary Vaccine Potency Testing: Improvement of the NIH Method, *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, **16**, 002850, <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2019.16.002850>.

5. Kim, J. Y., Rosenberger, M. G., Rutledge, N. S., and Esser-Kahn, A. P. (2023) Next-generation adjuvants: applying engineering methods to create and evaluate novel immunological responses, *Pharmaceutics*, **15**, 1687, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061687>.
6. Sun, H. X., Xie, Y., and Ye, Y. P. (2009) Advances in saponin-based adjuvants, *Vaccine*, **27**, 1787-1796, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.091>.
7. Leroux-Roels, G. (2010) Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response, *Vaccine*, **28**, 25-36, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.021>.
8. Shi, S., Zhu, H., Xia, X., Liang, Z., Ma, X., and Sun, B. (2019) Vaccine adjuvants: understanding the structure and mechanism of adjuvanticity, *Vaccine*, **37**, 3167-3178, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.055>.
9. Gupta, T., and Gupta, S. K. (2020) Potential adjuvants for the development of a SARS-CoV-2 vaccine based on experimental results from similar coronaviruses, *Int. Immunopharmacol.*, **86**, 106717, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106717>.
10. Halperin, S. A., Van Nest, G., Smith, B., Abtahi, S., Whiley, H., and Eiden, J. J. (2003) A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant, *Vaccine*, **21**, 2461-2467, [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00045-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00045-8).
11. Soldi, C., Pizzolatti, M. G., Luiz, A. P., Marcon, R., Meotti, F. C., Mioto, L. A., and Santos, A. R. (2008) Synthetic derivatives of the alpha- and beta-amyrin triterpenes and their antinociceptive properties, *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 3377-3386, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.12.008>.
12. Wilson-Welder, J. H., Torres, M. P., Kipper, M. J., Mallapragada, S. K., Wannemuehler, M. J., and Narasimhan, B. (2009) Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches, *J. Pharm. Sci.*, **98**, 1278-1316, <https://doi.org/10.1002/jps.21523>.
13. Montaner, A., Nichilo, A., Rodriguez, J., Hernando-Insua, A., Fló, J., Lopez, R., Sierra, V., Paolazzi, C., Larghi, O., Horn, D., Zorzopulos, J., and Elias, F. (2012) IMT504: a new and potent adjuvant for rabies vaccines permitting significant dose sparing, *World J. Vaccines*, **2**, 182-188, <https://doi.org/10.4236/wjv.2012.24025>.
14. Hu, X., Liu, R., and Zhu, N. (2013) Enhancement of humoral and cellular immune responses by monophosphoryl lipid A (MPLA) as an adjuvant to the rabies vaccine in BALB/c mice, *Immunobiology*, **218**, 1524-1528, <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.05.006>.
15. Coffman, R. L., Sher, A., and Seder, R. A. (2010) Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work, *Immunity*, **33**, 492-503, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>.
16. Stepanova, L. A., Mardanov, E. S., Shuklina, M. A., Blokhina, E. A., Kotlyarov, R. Y., Potapchuk, M. V., Kovaleva, A. A., Vidyaeva, I. G., Korotkov, A. V., Eletskaia, E. I., Ravin, N. V., and Tsybalova, L. M. (2018) Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses a subtypes, *J. Biomed. Sci.*, **25**, 33, <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0433-5>.
17. Софронов Г. А., Мурзина Е. В., Болехан В. Н., Веселова О. М., Симбирцев А. С. (2017) Перспективные направления использования препаратов на основе рекомбинантного флагеллина, *Мед. Акад. Журн.*, **17**, 7-20, <https://doi.org/10.17816/MAJ1727-20>.
18. Cui, B., Liu, X., Fang, Y., Zhou, P., Zhang, Y., and Wang, Y. (2018) Flagellin as a vaccine adjuvant, *Expert Rev. Vaccines*, **17**, 335-349, <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1457443>.
19. Daas, A., Bruckner, L., and Milne, C. (2015) EDQM biological reference preparation for rabies vaccine (inactivated) for veterinary use, *Pharmeur. Bio. Sci. Notes*, **2015**, 57-72.
20. Schiffelers, M. J., Blaauboer, B. J., Bakker, W. E., and Hendriksen, C. F. (2015) Regulatory acceptance and use of serology for inactivated veterinary rabies vaccines, *ALTEX*, **32**, 211-221, <https://doi.org/10.14573/altex.1501261>.
21. Гребенюк А. Н., Аксенова Н. В., Петров А. В., Аль-Шехадат Р. И., Климов Н. А., Симбирцев А. С. (2013) Получение различных вариантов рекомбинантного флагеллина и оценка их радиозащитной эффективности, *Вестник Российской Воен. Мед. Акад.*, **3**, 75-80.
22. Nikitin, N., Trifonova, E., Evtushenko, E., Kirpichnikov, M., Atabekov, J., and Karpova, O. (2015) Comparative study of non-enveloped Icosahedral viruses size, *PLoS One*, **10**, e0142415, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142415>.
23. Reed, L. J., and Muench, H. (1938) A simple method of estimating fifty per cent end points, *Am. J. Hyg.*, **27**, 493-497, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>.
24. Szaret, P. (1996) General consideration in testing the safety and potency of rabies vaccine, in *Laboratory Techniques in Rabies*, 4th Edn (Meslin, F. X., Kaplan, M. M., and Koprowski, H., eds) Geneva, Switzerland, World Health Organisation, pp. 355-359.
25. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. (1962) *Статистические методы в микробиологических исследованиях*, Медгиз, Ленинград.

26. Rupprecht, C. E., Fooks, A. R., and Abela-Ridder, B. (2018) Laboratory techniques in rabies, *World Health Organization*, 5th Edn, Vol. 1, 108-123.
27. Servat, A., Picard-Meyer, E., Robardet, E., Muizniece, Z., Must, K., and Cliquet, F. (2012) Evaluation of a rapid immunochromatographic diagnostic test for the detection of rabies from brain material of European mammals, *Biologicals*, **40**, 61-66, <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.12.011>.
28. Stokes, W., McFarland, R., Kulpa-Eddy, J., Gatewood, D., Levis, R., Halder, M., Pulle, G., Kojima, H., Casey, W., Gaydamaka, A., Miller, T., Brown, K., Lewis, C., Chapsal, J. M., Bruckner, L., Gairola, S., Kamphuis, E., Rupprecht, C. E., Wunderli, P., McElhinney, L., De Mattia, F., Gamoh, K., Hill, R., Reed, D., Doelling, V., Johnson, N., Allen, D., Rinckel, L., and Jones, B. (2012) Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: State of the science and planning the way forward, *Biologicals*, **40**, 369-381, <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.005>.
29. Akkermans, A., Chapsal, J. M., Coccia, E. M., Depraetere, H., Dierick, J. F., Duangkhae, P., Goel, S., Halder, M., Hendriksen, C., Levis, R., Pinyosukhee, K., Pullirsch, D., Sanyal, G., Shi, L., Sitrin, R., Smith, D., Stickings, P., Terao, E., Uhlrich, S., Viviani, L., and Webster, J. (2020) Animal testing for vaccines. Implementing replacement, reduction and refinement: challenges and priorities, *Biologicals*, **68**, 92-107, <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.07.010>.
30. Lin, H., and Perrin, P. (1999) Influence of aluminum adjuvant to experimental rabies vaccine, *Chin. J. Exp. Clin. Virol.*, **13**, 133-135.
31. Jones, L. S., Peek, L. J., Power, J., Markham, A., Yazzie, B., and Middaugh, C. R. (2005) Effects of adsorption to aluminum salt adjuvants on the structure and stability of model protein antigens, *J. Biol. Chem.*, **280**, 13406-13414, <https://doi.org/10.1074/jbc.M500687200>.
32. Hogenesch, H. (2013) Mechanisms of immunopotentiality and safety of aluminium adjuvants, *Front. Immunol.*, **3**, 406, <https://doi.org/10.3389/fmmu.2012.00406>.
33. Lin, Y. J., Shih, Y. J., Chen, C. H., and Fang, C. T. (2018) Aluminum salts as an adjuvant for pre-pandemic influenza vaccines: a meta-analysis, *Sci. Rep.*, **8**, 11460, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29858-w>.
34. Yu, P., Yan, J., Wu, W., Tao, X., Lu, X., Liu, S., and Zhu, W. (2018) A CpG oligodeoxynucleotide enhances the immune response to rabies vaccination in mice, *Virol. J.*, **15**, 174, <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1089-1>.
35. Авдеева Ж. И., Акользина С. Е., Алпатова Н. А., Мовсесянц А. А., Медуницын Н. В. (2007) Действие цитокинов на протективные свойства антирабической вакцины, *Цитокины Воспаление*, **6**, 46-50.
36. Zhang, Y., Zhang, S., Li, W., Hu, Y., Zhao, J., Liu, F., Lin, H., Liu, Y., Wang, L., Xu, S., Hu, R., Shao, H., and Li, L. (2016) A novel rabies vaccine based-on toll-like receptor 3 (TLR3) agonist PIKA adjuvant exhibiting excellent safety and efficacy in animal studies, *Virology*, **489**, 165-172, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.10.029>.
37. Nikitin, N. A., Matveeva, I. N., Trifonova, E. A., Puhova, N. M., Samuylenko, A. Y., Gryn, S. A., Atabekov, J. G., and Karpova, O. V. (2018) Spherical particles derived from TMV virions enhance the protective properties of the rabies vaccine, *Data Brief*, **21**, 742-745, <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.10.030>.
38. Huleatt, J. W., Jacobs, A. R., Tang, J., Desai, P., Kopp, E. B., Huang, Y., Song, L., Nakaar, V., and Powell, T. J. (2006) Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity, *Vaccine*, **25**, 763-775, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.08.013>.
39. Hajam, I. A., Dar, P. A., Shahnawaz, I., Jaume, J. C., and Lee, J. H. (2017) Bacterial flagellin – a potent immunomodulatory agent, *Exp. Mol. Med.*, **49**, e373, <https://doi.org/10.1038/emm.2017.172>.
40. Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. M., and Rappuoli, R. (2010) New adjuvants for human vaccines, *Curr. Opin. Immunol.*, **22**, 411-416, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.04.004>.
41. Skountzou, I., Martin, M., Wang, B., Ye, L., Koutsouanos, D., Weldon, W., Jacob, J., and Compans, R. W. (2010) *Salmonella* flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine, *Vaccine*, **28**, 4103-4112, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.058>.
42. McDonald, W. F., Huleatt, J. W., Foellmer, H. G., Hewitt, D., Tang, J., Desai, P., Price, A., Jacobs, A., Takahashi, V. N., Huang, Y., Nakaar, V., Alexopoulou, L., Fikrig, E., and Powell, T. J. (2007) A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity, *J. Infect. Dis.*, **195**, 1607-1617, <https://doi.org/10.1086/517613>.
43. Xiao, X. X., Zhang, Y., Liu, J. X., Wei, Q. L., and Yin, X. P. (2016) Immunoenhancement with flagellin as an adjuvant to whole-killed rabies vaccine in mice, *Arch. Virol.*, **161**, 685-691, <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2704-8>.

PROTECTIVE ACTIVITY OF INACTIVATED RABIES VACCINE USING FLAGELLIN-BASED ADJUVANT

O. O. Sokol¹, N. A. Nikitin^{2*}, E. A. Evtushenko², O. V. Karpova², I. N. Matveeva^{1,3},
S. A. Gryn¹, V. M. Popova¹, I. V. Ivanov¹, Y. N. Fedorov¹, and I. Y. Litenkova³

¹ *All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry,
141142 Biocombinat, Moscow Region, Russia*

² *Biology faculty, Lomonosov Moscow state University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru*

³ *Shchelkovo Biocombinat Federal State Enterprise, 141142 Biocombinat, Moscow Region, Russia*

Rabies is a zoonotic disease with a high degree of lethality. Most human deaths are related to bites received from dogs and cats. Vaccination is the most effective method of preventing rabies disease in both animals and humans. In this study, the ability of an adjuvant based on recombinant *Salmonella typhimurium* flagellin to increase the protective activity of an inactivated rabies vaccine in mice was evaluated. A series of inactivated dry culture vaccine for dogs and cats "Rabikan" (strain "Shchelkovo-51") with the addition of an adjuvant in various dilutions were used. The control preparation was a similar series of inactivated dry culture vaccine without an adjuvant. The protective activity of vaccine preparations was evaluated by the NIH potency test, which is the most widely used and internationally recommended method of determining the effectiveness for testing inactivated rabies vaccines. The value of the specific activity of the tested rabies vaccine when co-administered with an adjuvant was significantly higher (48.69 IU/ml) than that of the vaccine without an adjuvant (3.75 IU/ml). Thus, recombinant flagellin can be considered as an effective adjuvant in the composition of future vaccine preparations against rabies virus.

Keywords: rabies, inactivated vaccine, adjuvant, flagellin, specific activity, NIH-test