



## Разработка и лабораторное получение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов, оценка их адъювантных свойств при иммунизации мышей гриппозными антигенами

В.А. Евсеенко , А.С. Гудымо, Н.В. Данильченко, С.В. Святченко, О.С. Таранов, А.Б. Рыжиков

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости, АБК, корп. 12а, р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

 Евсеенко Василий Александрович; [evseenko\\_va@vector.nsc.ru](mailto:evseenko_va@vector.nsc.ru)

### Резюме

Пандемия COVID-19 обострила потребность общества в эффективных вакцинных препаратах. В этих условиях существенную финансовую поддержку получили разработки ряда инновационных вакцин, в том числе вакцин, в состав которых входят адъюванты на основе сапонинов. В 2021 г. ВОЗ была одобрена первая противомаларийная вакцина Mosquirix, содержащая сапонины. На стадии одобрения находится вакцина Novavax против COVID-19. Перспективным подходом к созданию вакцин является использование вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов (ИСКОМ) на основе сапонинов и создание на их основе комплексов с антигеном (ИСКОМ-антиген). **Цель работы:** получение и изучение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов Квиллайи мыльной (*Quillaja saponaria*), а также аналогов на основе сапонинов Синюхи голубой (*Polemonium caeruleum*), полученных из отечественного сырья. **Материалы и методы:** с применением метода жидкостной хроматографии получали препараты ИСКОМ адъювантов – Матрикс-ВQ и Матрикс-ВР. Проведено электронно-микроскопическое исследование препаратов. Иммунизацию мышей Balb/c препаратами ИСКОМ-антиген проводили интраперитонеально и внутримышечно. Иммунизированных животных заражали адаптированным летальным для мышей штаммом вируса гриппа A/California/4/2009 (H1N1) pdm09. Образцы сыворотки крови иммунизированных животных исследовали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). **Результаты:** получены ИСКОМ, содержащие сапонины Синюхи голубой и Квиллайи мыльной. В образцах сыворотки крови животных, однократно внутримышечно иммунизированных препаратом ИСКОМ-антиген, содержащим по 1 мкг гемагглютинаина каждого из штаммов вирусов гриппа A/Brisbane/02/2018 (H1N1) pdm09, A/Kansas/14/2017 (H3N2), B/Phuket/3073/2013, значения титров антител в РТГА составили более 1:40 к соответствующим антигенам. При двукратном внутримышечном введении препарата ИСКОМ-антиген, содержащего 50 нг каждого антигена, был выявлен протективный ответ. Максимальные значения титров антител в РТГА выявлены при двукратном интраперитонеальном введении препарата ИСКОМ-антиген и составили 1:20480 к гемагглютинину вакцинного штамма A/Kansas/14/2017 (H3N2). Показано, что двукратное внутримышечное введение 5 мкг, 1 мкг, 200 нг, 50 нг препарата ИСКОМ-антиген и 5 мкг, 1 мкг, 200 нг контрольного антигена коммерчески доступной вакцины мышам, впоследствии зараженным летальным штаммом вируса гриппа A/California/4/2009 (H1N1) pdm09, защищает экспериментальных животных от гибели. **Выводы:** полученные препараты на основе ИСКОМ обладали высокой иммуностимулирующей активностью в исследовании на мыш-

ной модели. Представленные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения препаратов на основе ИСКОМ при разработке как противовирусных, так и иммунокорректирующих препаратов.

**Ключевые слова:** вирусоподобные иммуностимулирующие комплексы; ИСКОМ; адъювант; сапонин; вакцина; иммунизация; грипп; респираторная инфекция

**Для цитирования:** Евсеенко В.А., Гудымо А.С., Данильченко Н.В., Святченко С.В., Таранов О.С., Рыжиков А.Б. Разработка и лабораторное получение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов, оценка их адъювантных свойств при иммунизации мышей гриппозными антигенами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):170–186. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-170-186>

## Development and laboratory production of virus-like immune-stimulating complexes based on saponins and evaluation of their adjuvant potential using mice immunisation with influenza antigens

V.A. Evseenko ✉, A.S. Gudymo, N.V. Danilchenko, S.V. Svyatchenko, O.S. Taranov, A.B. Ryzhikov

State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, World-class genomic research center for biological safety and technological independence, ABK, 12A, Koltsovo, Novosibirsk Region 630559 Russian Federation

✉ Vasily A. Evseenko; [evseenko\\_va@vector.nsc.ru](mailto:evseenko_va@vector.nsc.ru)

### Abstract

The COVID-19 pandemic has exacerbated the public's need for effective vaccines. Consequently, significant financial support has been provided to developers of a number of innovative vaccines, including the vaccines with saponin-based adjuvants. In 2021, the World Health Organisation recommended Mosquirix, the first malaria vaccine, which contains a saponin adjuvant. An anti-covid vaccine by Novavax is in the approval phase. A promising approach to vaccine development is presented by the use of virus-like immune-stimulating complexes (ISCOMs) containing saponins and by the creation of combinations of ISCOMs with antigens. **The aim of the study** was to develop, produce and characterise virus-like immune-stimulating complexes based on saponins of *Quillaja saponaria*, as well as similar saponins of Russian-sourced *Polemonium caeruleum*. **Materials and methods:** The ISCOM adjuvants, Matrix-BQ and Matrix-BP, were produced using liquid chromatography and examined using electron microscopy. Balb/c mice were immunised intraperitoneally and intramuscularly with ISCOM-antigen preparations. Afterwards, the immunised animals were challenged with the influenza virus strain, A/California/4/2009(H1N1)pdm09, adapted and lethal to mice. The serum samples were examined using haemagglutination inhibition (HI) tests. **Results:** The authors produced the ISCOMs containing saponins of *Quillaja saponaria* and *Polemonium caeruleum*. After one intramuscular injection of either of the ISCOM-antigen preparations with 1 µg of each of A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09, A/Kansas/14/2017 (H3N2), and B/Phuket/3073/2013 haemagglutinin antigens (HAs), HI tests detected serum antibody titres to the corresponding antigens of ≥1:40. Two intramuscular injections of the ISCOM-antigen preparation containing 50 ng of each of the HAs and Matrix-BQ resulted in a protective response. In some animals, two intraperitoneal injections of ISCOM-antigen preparations resulted in the maximum antibody titre to the A/Kansas/14/2017 (H3N2) vaccine strain of 1:20,480. Two intramuscular injections of a test preparation containing 5 µg, 1 µg, 200 ng, or 50 ng of each of the HAs and Matrix-BQ or a control preparation containing 5 µg, 1 µg, or 200 ng of each of the HAs (commercially available vaccines) to the mice that

were afterwards infected with the lethal influenza strain protected the experimental animals from death. **Conclusions:** The ISCOM-based preparations had high immunostimulatory activity in the mouse-model study. The presented results indicate the potential of further studies of ISCOM-based preparations in terms of both vaccine and immunotherapeutic development.

**Key words:** virus-like immune-stimulating complexes; ISCOM; adjuvant; saponin; vaccine; immunisation; influenza; respiratory infection

**For citation:** Evseenko V.A., Gudymo A.S., Danilchenko N.V., Svyatchenko S.V., Taranov O.S., Ryzhikov A.B. Development and laboratory production of virus-like immune-stimulating complexes based on saponins and evaluation of their adjuvant potential using mice immunisation with influenza antigens. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2022;22(2):170–186. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-170-186>

## Введение

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 обострила проблемы, связанные с иммунопрофилактикой респираторных заболеваний вирусной природы. Для заболеваний, вызываемых респираторно-синцитиальным вирусом, сезонным коронавирусом, риновирусом, парамиксовирусом и другими, вакцины не применяются, а противогриппозные вакцины не обеспечивают продолжительную защиту. Одной из инновационных технологий является разработка вакцин на основе иммуностимулирующих комплексов – ИСКОМ (immune-stimulating complexes, ISCOM), в том числе создание вирусоподобных ИСКОМ на основе сапонинов. Сапонины относятся к семейству амфипатических растительных гликозидов и структурно состоят из липофильных тритерпеновых производных [1]. Отличительной особенностью некоторых растительных сапонинов является высокая аффинность к холестерину. Вирусоподобные комплексы размером около 40 нм, состоящие из сапонинов Квиллайи мыльной (*Quillaja saponaria*), холестерина и лецитина, имеющие выраженные иммуномодулирующие свойства при парентеральном введении, исследуются с середины 80-х годов прошлого века [1]. Первые образцы обладали высокой цитотоксичностью, и использование ИСКОМ в низкой концентрации в препарате не имело преимуществ по сравнению с хорошо зарекомендовавшим себя адьювантом – гидроокисью алюминия. С развитием биотехнологических систем фракционирования компонентов при разработке и производстве биопрепаратов стало возможным проводить сложные исследования, результаты которых продемонстрировали уникальные свойства этих наночастиц. Сапонинсодержащие адьюванты стимулируют врожденный и адаптивный клеточный иммунитет, а также гуморальный ответ, характеризующийся продукцией всех изоформ

IgG, таким образом, наблюдается формирование смешанного Th1/Th2 типа иммунного ответа. В ряде работ, в которых для иммунизации использовали сапонинсодержащие адьюванты, был выявлен выраженный клеточный иммунный ответ на растворимые белки, и в частности на овальбумин [2–4]. Была установлена основная роль дендритных клеток в этом процессе [4]. Для сравнения, препараты, содержащие гидроокись алюминия или масляные адьюванты, в основном стимулируют Th2-иммунный ответ. Показано, что именно сапонины в составе ИСКОМ являются молекулярным компонентом, формирующим инфламмосому [5]. Уникальные особенности ИСКОМ на основе сапонинов и установленные молекулярные механизмы их действия позволяют рассматривать их как перспективные адьювантные компоненты профилактических и терапевтических вакцин для борьбы с инфекционными и онкологическими заболеваниями.

Получение ИСКОМ возможно с применением различных биотехнологических методик. Это обусловлено сильным биохимическим родством сапонинов, лецитина и холестерина, которые в растворе детергента при понижении его концентрации формируют идентичные корпускулярные структуры, устойчивые при фракционировании. В физиологических растворах ИСКОМ заряжены отрицательно и при добавлении полярно заряженных вирусных антигенов связываются с ними, формируя комплексы ИСКОМ-антиген. Эти свойства позволяют проектировать аминокислотную последовательность антигенов таким образом, чтобы в их составе были положительно заряженные кластеры аминокислот, и формирование препарата ИСКОМ-антиген происходило с ожидаемой эффективностью [6]. Для получения ИСКОМ нами была использована гель-фильтрация (SEC).

Аналитические исследования указывают на высокую перспективность вакцин, содержа-

щих компонент на основе ИСКОМ, в частности адьювант Matrix-M (Novavax, США) [7]. Опасения, связанные с высокой реактогенностью Matrix-M, не оправдались. Препараты, содержащие Matrix-M, находятся на завершающих стадиях клинических исследований (КИ): вакцина против сезонного гриппа NanoFlu (Novavax, США) для применения в возрастной группе 65 лет и старше прошла фазу 3 КИ; вакцина против респираторного синцитиального вируса RSV F (Novavax, США) – фазу 3 КИ<sup>1</sup> [8]. Препарат для профилактики новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, NVX-CoV2373 (Novavax, США), успешно прошел клинические испытания [9] и официально одобрен.

В Российской Федерации активно применяются гриппозные вакцины, содержащие адьюванты Совидон и Полиоксидоний [10, 11]. В мировой практике применение адьювантов в гриппозных вакцинах произошло с запозданием. В настоящий момент доступны препараты, содержащие масляный адьювант MF59 [12]. В то же время, помимо незначительной экономии антигена, использование данных соединений не привело к существенным изменениям производственного процесса, при котором необходима ежегодная аттестация производственных штаммов ВОЗ, или кардинальному снижению заболеваемости гриппом.

Цель работы – получение и изучение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов Квиллайи мыльной (*Quillaja saponaria*), а также аналогов на основе сапонинов Синюхи голубой (*Polemonium caeruleum*), полученных из отечественного сырья.

## Материалы и методы

### Материалы:

- лаурил саркозинат натрия (Sodium Lauroyl Sarcosine, Amerco #0719-500G); холестерин (Cholesterol, PanReac Applichem #A0807); лецитин (Lecithin, PanReac Applichem #A0893); сапонины *Quillaja saponaria* (Saponin, *Quillaja saponaria*, PanReac Applichem #A2542); шприцевая фильтрующая насадка с размером пор 0,22 мкм (Minisart NML, Sartorius); гель-фильтрующий носитель Sephadex G-100 Superfine (GE Healthcare #17006101); фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7,4 (VWR #E404-200TABS);
- стандартные антигены вируса гриппа: A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019

(H1N1)pdm09; A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2); B/Washington/02/2019 (B/Victoria); B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata); A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09; B/Colorado/06/2017; A/Kansas/14/2017 (H3N2) (ООО «ППДП», Санкт Петербург, Россия);

- антигены A/YANAO/1/2019 (H1N1)pdm09, A/Russia/01/2009 (H1N1)pdm09, A/Solomon Islands/03/06 (H1N1), A/New Caledonia/20/1999 (H1N1), A/Texas/50/2012 (H3N2), A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (B/Victoria) (предоставлены отделом зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

В работе были использованы мыши линии Balb/c (предоставлены вивариумом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

### Методы

#### Получение иммуностимулирующих комплексов.

В пробирку объемом 15 мл (Corning #430055) вносили 3 мл деионизованной воды, в которую далее, работая в респираторе 3М (PPP), аккуратно, не допуская распыления, вносили навеску 500±50 мкг лаурил саркозината натрия. Далее встряхивали пробирку на вортексе до полного растворения детергента. Пробирку центрифугировали при 5000 g до исчезновения пены. Далее в пробирку вносили 30±5 мг холестерина и 30±5 мг лецитина. Смесь встряхивали на вортексе с интервалом 30 мин в течение 3 ч при комнатной температуре. За 30 мин до завершения инкубации отдельно в 2 мл деионизованной воды растворяли навеску 400±50 мг сапонинов Квиллайи мыльной (550000±26540 гемолитических единиц). После растворения сапонинов раствор фильтровали с использованием фильтрующей насадки с размером пор 0,22 мкм и вносили в смесь детергента, холестерина и лецитина. Смесь тщательно перемешивали на вортексе в течение 1 мин и далее инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре с периодическим встряхиванием на вортексе. После завершения инкубации смесь центрифугировали при 10000 g, шприцем на 15 мл с иглой отбирали содержимое из центра пробирки, не касаясь осадка и поверхностной пленки. Эту реакционную смесь фильтровали с использованием фильтрующей насадки с размером пор 0,22 мкм, после чего наносили на хроматографическую колонку НК-50 (GE Healthcare) с носителем

<sup>1</sup> Safety and immunogenicity study to evaluate single- or two-dose regimens of RSV F vaccine with and without aluminum phosphate or Matrix-M1™ adjuvants in clinically-stable older adults. NCT03026348. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03026348>

Sephadex G-100, уравновешенную ФСБ pH 7,4 и соединенную с хроматографом АКТА pure (General Electric Healthcare). Нанесение препарата на колонку осуществляли при скорости потока 200 мкл/мин. Хроматографию проводили при скорости потока 200 мкл/мин в течение 12 ч, а затем при скорости 500 мкл/мин в течение приблизительно 1,5 ч. Выход частиц фиксировали в первом характерном пике при длине волны 280 нм. Раствор с частицами обладал выраженными опалесцирующими свойствами. В зависимости от лабораторной серии выход продукта составлял 30–40 мл. Непосредственно после завершения процедуры проводили стерилизующую фильтрацию с использованием фильтрующей насадки с размером пор 0,22 мкм. Препарат хранили до иммунизации при 4 °С не более 30 сут. Срок хранения, установленный с помощью определения 50% летальной дозы для мышей при интраперитонеальном введении (ИМЛД<sub>50</sub>), на момент публикации составил 7 мес. (методика определения ИМЛД<sub>50</sub> приведена далее). Замораживание препарата не допускается, так как часть препарата агрегирует и выпадает в осадок.

ИСКОМ на основе сапонинов Синюхи голубой изготавливали идентичным способом со следующими изменениями. В реакционную смесь добавляли сапонины Синюхи голубой, стандартизованные в гемолитической реакции (550000±36562 ед.). Выделение сапонинов из Синюхи голубой проводили согласно методике, описанной ранее [13]. Оптическую плотность раствора частиц измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм для сравнительной оценки потерь [14].

**Определение единицы дозирования иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов Синюхи голубой (Матрикс-ВР) и Квиллайи мыльной (Матрикс-ВQ).** Для некоторых биопрепаратов, например для токсинов, ферментов и др., биологическая активность может не в полной мере соответствовать концентрации, определяемой физико-химическими методами. Методов биологической стандартизации ИСКОМ ранее не описано. В данной работе мы применили биологическую пробу, аналогичную проводимой для токсинов. Природа токсичности при интраперитонеальном введении ИСКОМ связана с гиперпродукцией цитокинов, приводящей к шоку и гибели животного. В ходе предварительных тестов с вирусоподобными иммуностимулиру-

ющими комплексами Матрикс-ВР и Матрикс-ВQ было установлено, что при интраперитонеальном введении ИСКОМ наблюдалась гибель мышей на первые или вторые сутки. При этом цитолитической активности у препаратов не наблюдалось при внесении даже 20-кратного концентрата исходного продукта. Также не наблюдалось цитопатического эффекта для культур клеток MDCK и Vero при внесении 20-кратных концентратов исходного продукта ИСКОМ. В связи с этим было принято решение проводить стандартизацию и дозирование препаратов на основе 50% летальной дозы для мышей при интраперитонеальном введении (ИМЛД<sub>50</sub>), принятой за 1 ед. активности. Мышам линии Balb/c (5 мышей, самцы 18–20 г в группе) интраперитонеально вводили 200 мкл 5-кратных разведений полученных препаратов в ФСБ (pH 7,4). Учитывали гибель животных на 1–3 сут после введения. Рассчитывали ИМЛД<sub>50</sub> по методу Рида и Менча [15].

**Иммунизация и заражение экспериментальных животных.** Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен Биоэтической комиссией № 1 при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол ГНЦ ВБ «Вектор»/03-04.2021). До начала иммунизации экспериментальные животные находились на адаптационном карантине и стандартном рационе вивария *ad libitum*.

Инфицирование животных вирусом гриппа A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 проводили интраназально дозой 25 ЛД<sub>50</sub> в объеме 50 мкл. Животных перед заражением наркотизировали с использованием комбинации препаратов Золетил 100 и Ксила, которые вводили внутримышечно. После инфицирования, начиная с 3 сут, регистрировали гибель животных в течение 21 сут. Далее оставшихся животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации с соблюдением правил гуманного обращения с животными<sup>2</sup>. В случае, если у животного в результате тяжелого течения заболевания развивалось состояние, не совместимое с жизнью, выражавшееся в потере более 20% изначальной массы тела, на пике болезни проводили эвтаназию животного.

Для проведения интраперитонеальной иммунизации было сформировано 7 групп по 5 животных. Мышей линии Balb/c иммунизировали интраперитонеально посредством введения 200 мкл препарата ИСКОМ-

<sup>2</sup> Руководство по работе с лабораторными животными для сотрудников ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, занятых проведением доклинических испытаний. М.: Изд-во ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова; 2015.

антиген, в состав которого входило по 7,5 мкг или по 2 мкг гемагглютинаина трех вакцинных штаммов вирусов гриппа и 0,1 ИМЛД<sub>50</sub>/мл Матрикс-ВР или Матрикс-ВQ. Препарат готовили за 1 ч до иммунизации. Для приготовления препарата ИСКОМ-антиген использовали антигены вакцины гриппозной трехвалентной инактивированной расщепленной, содержащей 15 мкг гемагглютинаина каждого из вакцинных штаммов вирусов гриппа A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09, B/Colorado/06/2017, A/Kansas/14/2017 (H3N2) без адьюванта. В качестве положительного контроля использовали препараты, содержащие аналогичную концентрацию антигенов, но не содержащие ИСКОМ адьювант. Группе отрицательного контроля вводился ИСКОМ Матрикс-ВQ. На 142 сут проводили повторную иммунизацию идентичными препаратами. На 14, 28, 142 и 170 сут у мышей отбирали кровь из орбитального синуса для анализа образцов сыворотки крови.

Последующий эксперимент предполагал определение нижней границы концентрации гемагглютининов, вызывающей при внутримышечном введении 10 ИМЛД<sub>50</sub> Матрикс-ВQ образование антител, детектируемых в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Использовали инактивированную четырехвалентную расщепленную вакцину, содержащую антигены A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2), B/Washington/02/2019 (B/Victoria), B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata). Группы по 5 животных внутримышечно иммунизировали препаратом ИСКОМ-антиген, содержащим 5, 1, 0,2 или 0,05 мкг каждого гемагглютинаина, дозу 10 ИМЛД<sub>50</sub>/мл Матрикс-ВQ. В качестве положительного контроля было сформировано 4 группы по 5 животных, которых иммунизировали внутримышечно 5, 1, 0,2 или 0,05 мкг каждого гемагглютинаина без ИСКОМ адьюванта. В качестве отрицательного контроля использовали мышей, которым внутримышечно вводили дозу 10 ИМЛД<sub>50</sub>/мл Матрикс-ВQ. Использование препарата, содержащего только сапонины Квиллайи мыльной, обусловлено коммерческой доступностью сырья для изготовления. Доза адьюванта при внутримышечном введении была выбрана исходя из того, что доза 10 ИМЛД<sub>50</sub> ИСКОМ Матрикс-ВQ при введении мышам внутримышечно не вызывала определяемых визуально нарушений поведения, циркадных ритмов, а также нарушения динамики набора веса. Эта доза может быть неоптимальной и, возможно, потребует уточнения при дальнейших работах с более крупными животными. Кровь у животных отбирали на 21

сут после первой иммунизации, в этот же день осуществляли вторую иммунизацию и на 21 сут после второй иммунизации также отбирали кровь для анализа сыворотки в РТГА. На 42 сут после первой иммунизации всех животных заражали адаптированным к мышам летальным штаммом вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 в дозе 25 ЛД<sub>50</sub>. За мышами наблюдали в течение 21 сут, учитывали погибших животных. На 27 сут после заражения у выживших животных отбирали кровь для анализа образцов сыворотки в РТГА. РТГА и гемолитическую реакцию проводили согласно методике, описанной V. Evseenko с соавт. [16]. Для вычисления значений средних геометрических титров (СГТ) и погрешностей измерения считали, что титр ниже предела детекции равен 1:10.

**Электронная микроскопия.** Для электронно-микроскопического исследования полученные препараты, подвергшиеся стерилизующей фильтрации через фильтр-насадку 0,22 мкм, наносили в объеме 15 мл в мембранный центрифужный концентратор с мембраной 100 кДа (Millipore). Центрифугировали в течение 1 ч при 1500 g (ротор 12150-H, Sigma). Концентрат переносили в пробирки в объеме 150 мкл. Изображения получены методом негативного контрастирования 1% уранилацетатом с анализом на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, США).

**Определение остаточной концентрации детергента.** Остаточный детергент в препаратах Матрикс-ВР, Матрикс-ВQ определяли в реакции гемолиза. Лаурил саркозинат натрия, применяемый при изготовлении ИСКОМ Матрикс-ВQ и Матрикс-ВР, является детергентом и в следовых количествах обладает способностью лизировать эритроциты. Для оценки гемолитической активности использовали эритроциты петуха. Гемолитическую активность препаратов сравнивали с гемолитической активностью стандартного раствора детергента. Для приготовления стандартного раствора детергента навеску лаурил саркозината натрия 0,015±0,002 г растворяли в 1 мл ФСБ (pH 7,4).

Гемолитическую реакцию проводили в микроварианте в 96-луночных полистироловых планшетах [16]. На одном планшете готовили двукратные разведения исследуемых растворов ИСКОМ (Матрикс-ВР и Матрикс-ВQ) и стандартного раствора детергента в повторях, после чего добавляли по 50 мкл 0,5% суспензии эритроцитов петуха. При завершении оседания эритроцитов в контрольных лунках учитывали лизис эритроцитов в стандартных и экспериментальных лунках. Рассчитывали предельные

разведения препаратов, вызывающие лизис эритроцитов.

## Результаты

Предложенная лабораторная технология позволила получать препараты ИСКОМ адьювантов в объеме  $42,0 \pm 5,7$  мл (15 серий): Матрикс-ВР или Матрикс-ВQ-содержащих растворов (в 1 мл  $77,9 \pm 8,3$  ИМЛД<sub>50</sub>). Растворы характеризуются выраженной опалесценцией. При фильтрации через фильтр-насадку 0,22 мкм контролировали потерю активного компонента спектрофотометрически при длине волны 280 нм. В препаратах Матрикс-ВР, Матрикс-ВQ минимальная концентрация, вызывающая лизис эритроцитов, составила  $107 \pm 11$  мкг/мл.

Частицы, полученные с использованием сапонинов Квиллайи мыльной, имели размер около 40 нм и характерную клетчатую (cage-like) структуру (рис. 1А, 1D). Данные характеристики аналогичны ранее описанным ИСКОМ, в том числе препарату Matrix-M, входящему в состав вакцины NVX-CoV2373 (Novavax, США) для профилактики COVID-19 [9].

Изучая снимки препарата до и после инкубации с антигенами вирусов гриппа, можно уверенно сделать вывод о том, что антиген распределен по поверхности частицы. Важно отметить, что не наблюдается свободного антигена в поле зрения (рис. 1В, 1F).

Частицы, изготовленные с использованием сапонинов Синюхи голубой, имеют размер 250–330 нм и слабовыраженную клетчатую структуру (рис. 1С, 1Е). При стерилизующей фильтрации фиксировались потери  $8,3 \pm 4,0\%$ . По сравнению с частицами с размером 40 нм на основе Квиллайи мыльной в препаратах на основе Синюхи голубой более отчетливо видна ассоциация антигенов вирусов гриппа с частицами, визуально представленная в виде электронно-прозрачного вещества на поверхности частицы (рис. 1С, 1F).

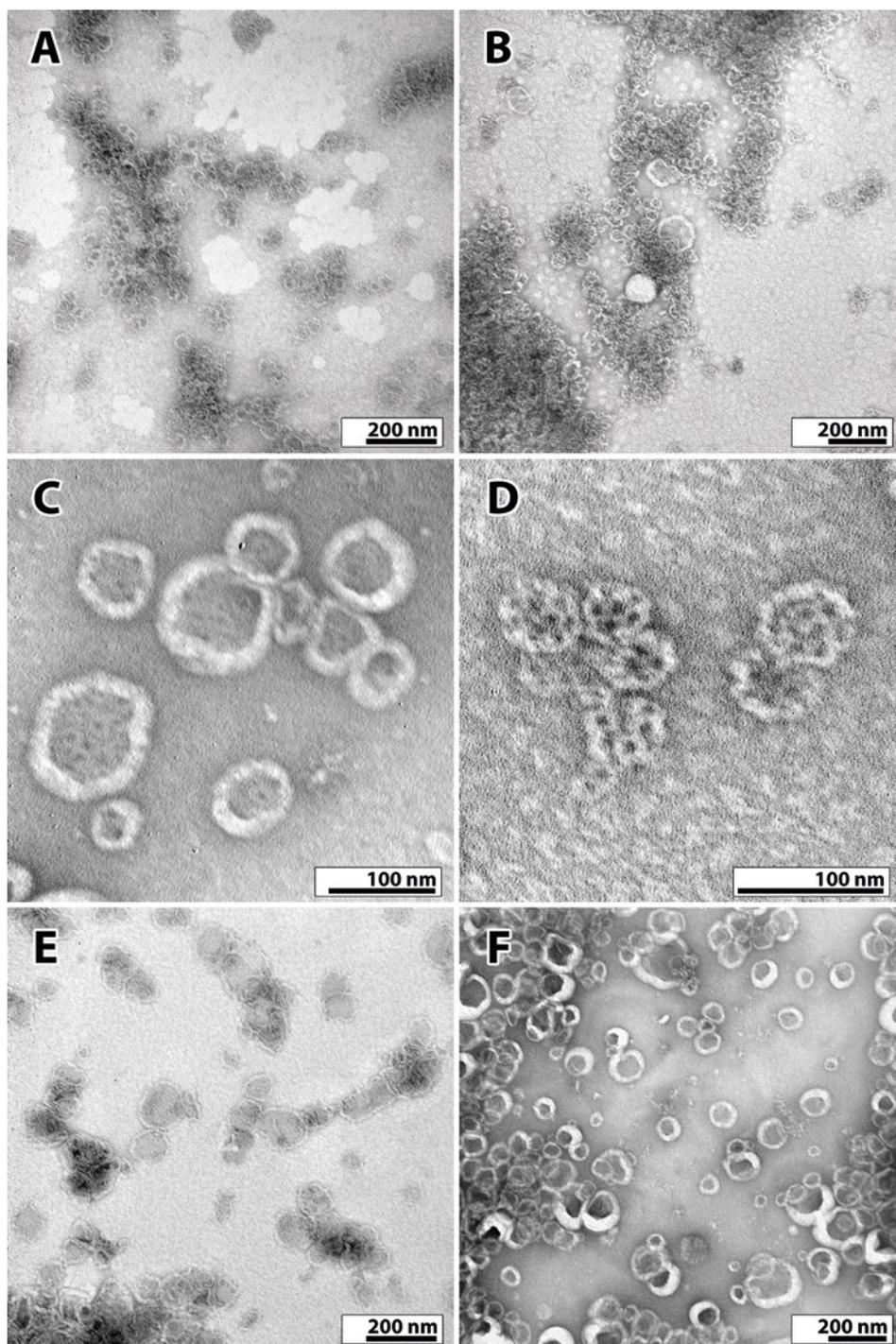
### **Оценка эффективности интраперитонеальной иммунизации мышей иммуностимулирующими комплексами**

Результаты проведения РТГА с образцами сыворотки крови мышей, иммунизированных интраперитонеально, представлены в виде значений СГТ антител на рисунках 2А, 2В и 3А, 3В. Для анализа и обсуждения выбраны группы, в которых значения СГТ составили 1:40 и выше для выбранного типа антигена (протективный уровень)<sup>3</sup>.

В сыворотке крови животных, взятой на 14 сут после иммунизации, только у некоторых животных фиксировалась сероконверсия (рис. 2А). К 28 сут после иммунизации препаратом во всех экспериментальных группах и группах положительного контроля наблюдался подъем значений титров антител к компонентам А/(Н1N1)pdm09 и А/(Н3N2). На компонент вируса гриппа В значения титров 1:40 и выше были только в группе животных, иммунизированных препаратом ИСКОМ-антиген: комплексом 2 мкг каждого антигена + 0,1 ИМЛД<sub>50</sub> Матрикс-ВQ. Внутри экспериментальных групп и групп положительного контроля не отмечено статистически значимых отличий ( $P=0,95$ ) между значениями СГТ на А/(Н1N1)pdm09 и А/(Н3N2) компоненты на 28 сут. Важно отметить, что значения СГТ к А/(Н1N1)pdm09 и А/(Н3N2) компонентам в группах, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген: комплексом 2 мкг антигена + 0,1 ИМЛД<sub>50</sub> Матрикс-ВР; комплексом 7,5 мкг антигена + 0,1 ИМЛД<sub>50</sub> Матрикс-ВQ; комплексом 2 мкг антигена + 0,1 ИМЛД<sub>50</sub> Матрикс-ВQ, были статистически достоверно выше ( $P=0,95$ ) в 3,0; 3,5; 5,3 раза (в случае антигенного компонента А/(Н1N1)pdm09) и в 5,3; 6,0; 13,9 раза (в случае антигенного компонента А/(Н3N2)) в сравнении со значениями СГТ в ответ на препарат положительного контроля, содержащий 7,5 мкг каждого антигена без ИСКОМ адьюванта. Наиболее сильный ответ был отмечен для препарата, содержащего по 2 мкг антигена и 0,1 ИМЛД<sub>50</sub> Матрикс-ВQ (рис. 2В).

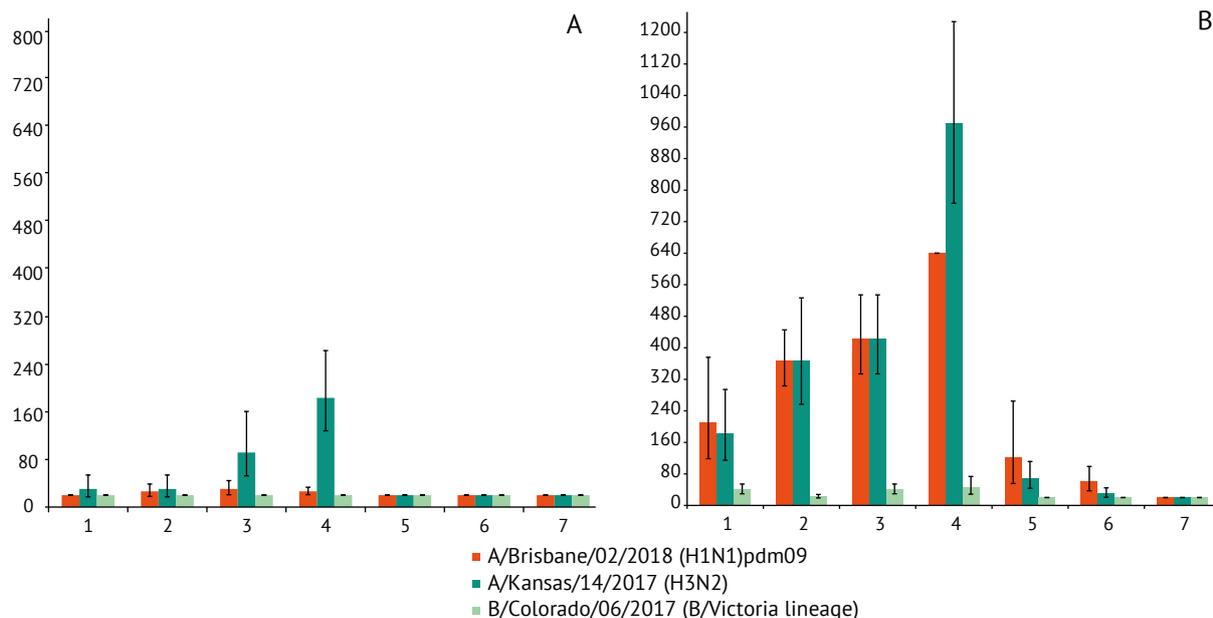
На 142 сут (около 4,5 мес.) после иммунизации наблюдалось снижение титров ко всем антигенным компонентам во всех группах, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген. Из-за неоднородности ответа снижение у разных животных происходило по-разному. Статистически достоверные различия ( $P=0,95$ ) наблюдались между группами животных, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген: комплексом 2 мкг антигена + 0,1 ИМЛД<sub>50</sub> Матрикс-ВР; комплексом 7,5 мкг антигена + 0,1 ИМЛД<sub>50</sub> Матрикс-ВQ; комплексом 2 мкг антигена + 0,1 ИМЛД<sub>50</sub> Матрикс-ВQ в сравнении с группой положительного контроля, иммунизированной 2 мкг каждого антигена без ИСКОМ адьюванта (рис. 3А). Важно отметить, что во всех группах также не было статистически достоверных различий ( $P=0,95$ ) СГТ на антигенные компоненты А/(Н1N1)pdm09 и А/(Н3N2). Во всех группах фактически не определялся ответ на антиген гриппа В или был на пределе определения (рис. 3А).

<sup>3</sup> Методические указания МУ 3.1.3490-17 Изучение популяционного иммунитета к гриппу у населения Российской Федерации (утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 27.10.2017); 2017.



**Рис. 1.** Фотографии частиц иммуностимулирующих комплексов, полученных с использованием сапонинов *Quillaja* мыльной: А – 100-кратный концентрат Матрикс-ВQ, В – 100-кратный концентрат Матрикс-ВQ после инкубации с антигенами гриппозной вакцины. Ультраструктура частиц иммуностимулирующих комплексов: С – частицы Матрикс-ВР, изготовленных с использованием сапонинов *Polemonium caeruleum* Синюхи голубой; D – частицы Матрикс-ВQ, изготовленных с использованием сапонинов *Quillaja* мыльной. Фотографии частиц иммуностимулирующих комплексов, полученных с использованием сапонинов *Polemonium caeruleum* Синюхи голубой: E – 100-кратный концентрат Матрикс-ВР, F – 100-кратный концентрат Матрикс-ВР после инкубации с антигенами гриппозной вакцины.

**Fig. 1.** Images of the immune-stimulating complexes containing *Quillaja saponaria* saponins: (A) a concentrate (100×) of Matrix-BQ, (B) a concentrate (100×) of Matrix-BQ after incubation with influenza vaccine antigens. Ultrastructure of immune-stimulating complexes: Matrix-BP particles containing *Polemonium caeruleum* saponins (C); Matrix-BQ particles containing *Quillaja saponaria* saponins (D). Images of the immune-stimulating complexes containing *Polemonium caeruleum* saponins: (E) a concentrate (100×) of Matrix-BP, (F) a concentrate (100×) of Matrix-BP after incubation with influenza vaccine antigens.



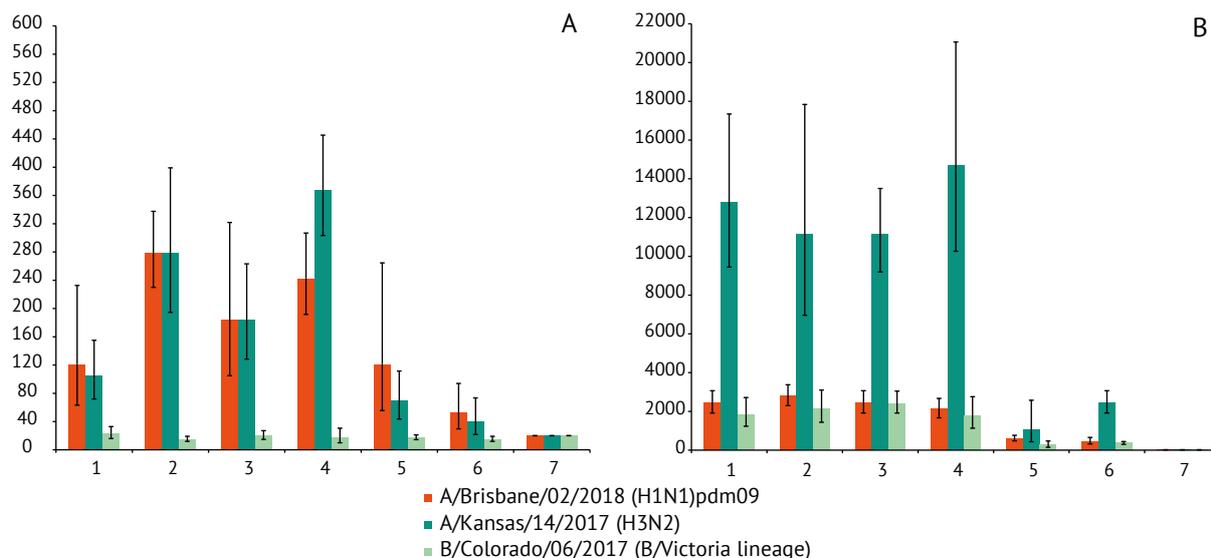
**Рис. 2.** Данные реакции торможения гемагглютинации с образцами сыворотки крови иммунизированных интраперитонеально мышей, взятыми на 14 (А) и 28 (В) сутки после иммунизации. Ось абсцисс — группы экспериментальных животных: 1 — Матрикс-ВР + 7,5 мкг антигена; 2 — Матрикс-ВР + 2 мкг антигена; 3 — Матрикс-ВQ + 7,5 мкг антигена; 4 — Матрикс-ВQ + 2 мкг антигена; 5 — 7,5 мкг антигена; 6 — 2 мкг антигена; 7 — Матрикс-ВQ без антигена (отрицательный контроль). Ось ординат — среднее геометрическое значений обратных титров антител. В легенде указаны антигены вирусов гриппа, использованные для иммунизации. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала при  $P=0,95$ .

**Fig. 2.** Data on haemagglutination inhibition in mouse serum samples taken on days 14 (A) and 28 (B) after intraperitoneal immunisation. The X-axis shows the experimental animal groups: (1) Matrix-BP + 7.5  $\mu$ g of each antigen; (2) Matrix-BP + 2  $\mu$ g of each antigen; (3) Matrix-BQ + 7.5  $\mu$ g of each antigen; (4) Matrix-BQ + 2  $\mu$ g of each antigen; (5) 7.5  $\mu$ g of each antigen; (6) 2  $\mu$ g of each antigen; (7) the negative control group of Matrix-BQ without antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The legend indicates the influenza virus antigens used for immunisation. Whiskers reflect confidence intervals at  $P=0.95$ .

После проведенной повторной интраперитонеальной иммунизации идентичными препаратами ИСКОМ-антиген в образцах сыворотки крови, взятых на 28 (170) сут после второй иммунизации, был отмечен значительный подъем значений титров. Анализ результатов РТГА показывает наличие статистически достоверных различий ( $P=0,95$ ) значений СГТ на антигенные компоненты А/(H1N1)pdm09, А/(H3N2) и В/Victoria между группами, иммунизированными препаратами, содержащими ИСКОМ адьюванты, и группами, иммунизированными без ИСКОМ адьювантов (рис. 3В). Достоверных различий ( $P=0,95$ ) значений СГТ к А/(H1N1)pdm09, А/(H3N2) и В/Victoria между группами, иммунизированными препаратом, содержащим 7,5 мкг или 2 мкг каждого антигена, нет. Существенным образом изменился титр антител к компоненту вируса гриппа В. Если на 142 сут он не определялся, то после второй инъекции достоверные различия ( $P=0,95$ ) между значениями СГТ к компонентам А/(H1N1)pdm09 и В/Victoria отсутствуют (рис. 3В). Максимальное значение СГТ к антигену В/Colorado/06/17 (В/Victoria) составило 1:2413 в группе, иммунизированной комплексом 7,5 мкг антигена +

0,1 ИМЛД<sub>50</sub> Матрикс-ВQ. Существенным образом выросли титры к А/(H3N2) компоненту. У некоторых животных, иммунизированных препаратами, содержащими ИСКОМ адьювант, титры были 1:20480, что для реакции торможения гемагглютинации можно назвать рекордными значениями. Значения СГТ к компоненту А/(H3N2) в конкретной группе животных, иммунизированных с ИСКОМ адьювантом, были в 4–7 и 4,6–8,3 раза выше, чем к компонентам А/(H1N1)pdm09 и В/Victoria соответственно. Сравнивая экспериментальные группы и группы положительного контроля, можно заключить, что в ответ на введение препаратов с ИСКОМ адьювантом значения СГТ в РТГА были выше в 4,6–12,1 раза в зависимости от типа антигена (рис. 3В).

Ранее полученные экспериментальные данные, а также данные, представленные в требованиях методических указаний, позволяют считать титры 1:40–1:80 протективными, а титры 1:320 и выше защищающими не только от тяжелого течения гриппа, но и от заражения [16]. Нами определены титры кросс-реактивности сывороток, полученных в этой работе, в РТГА с антигенами штаммов вирусов гриппа, ранее



**Рис. 3.** Данные реакции торможения гемагглютинации с образцами сыворотки крови иммунизированных интраперитонеально мышей, взятыми на 142 сутки после иммунизации (А) и на 28 сутки после повторной иммунизации (170 сутки после иммунизации) (В). Ось абсцисс – группы экспериментальных животных: 1 – Матрикс-ВР + 7,5 мкг антигена; 2 – Матрикс-ВР + 2 мкг антигена; 3 – Матрикс-ВQ + 7,5 мкг антигена; 4 – Матрикс-ВQ + 2 мкг антигена; 5 – 7,5 мкг антигена; 6 – 2 мкг антигена; 7 – Матрикс-ВQ без антигена (отрицательный контроль). Ось ординат – среднее геометрическое значений обратных титров антител. В легенде указаны антигены вирусов гриппа, использованные для иммунизации. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала при  $P=0,95$ .

**Fig. 3.** Data on haemagglutination inhibition in mouse serum samples taken on 142 day after intraperitoneal immunization (A) and 28 day after boosting second immunization (170 day after immunization) (B). The X-axis shows the experimental animal groups: (1) Matrix-BP + 7.5  $\mu$ g of each antigen; (2) Matrix-BP + 2  $\mu$ g of each antigen; (3) Matrix-BQ + 7.5  $\mu$ g of each antigen; (4) Matrix-BQ + 2  $\mu$ g of each antigen; (5) 7.5  $\mu$ g of each antigen; (6) 2  $\mu$ g of each antigen; (7) the negative control group of Matrix-BQ without antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The legend indicates the influenza virus antigens used for immunisation. Whiskers reflect confidence intervals at  $P=0.95$ .

использовавшимися для производства вакцин, эпидемическими штаммами, выделенными в культуре клеток от людей с диагнозом грипп, и допандемическим штаммом A/Solomon Islands/03/06 (H1N1). Результаты определения значений СГТ представлены в таблице 1.

#### Оценка эффективности внутримышечной иммунизации мышей иммуностимулирующими комплексами

Значения титров антител в образцах сыворотки крови мышей, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген с адъювантом Матрикс-ВQ, взятых на 21 сут после внутримышечной иммунизации, а также значения титров антител в образцах сыворотки крови контрольных животных, определенные в РТГА, представлены на рисунке 4А. Животные экспериментальных групп, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген: комплексом 1 мкг антигена + Матрикс-ВQ или комплексом 5 мкг антигена + Матрикс-ВQ, в РТГА против четырех антигенов A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2), B/Washington/02/2019 (B/Victoria), B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata) имели протективные значения СГТ 1:40 и выше.

В группе животных, иммунизированных комплексом ИСКОМ-антиген в дозе 200 нг антигена + Матрикс-ВQ, протективное значение СГТ 1:92 наблюдалось для A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09. Для остальных антигенов детектируемые в РТГА титры фиксировались у единичных животных. В группе мышей, иммунизированных комплексом ИСКОМ-антиген в дозе 50 нг антигена + Матрикс-ВQ, только у одного животного в РТГА детектировались титры к антигенам A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09 и B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage), которые, тем не менее, не достигали уровня 1:40. У мышей из этой группы не было выявлено титров к остальным антигенам. В группах положительного и отрицательного контролей антитела в сыворотке крови не детектировались в РТГА.

Значения титров антител в образцах сыворотки крови мышей, иммунизированных антигенами с ИСКОМ адъювантом Матрикс-ВQ, взятых на 42 сут после первой иммунизации (повторная иммунизация проводилась на 21 сут после первой), а также значения титров антител в образцах сыворотки крови контрольных животных, определенные в РТГА, представлены

**Таблица 1.** Результаты реакции торможения гемагглютинации в образцах сыворотки крови мышей, двукратно интраперитонеально иммунизированных 7,5 мкг или 2 мкг антигена вируса гриппа каждого субтипа (A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09; B/Colorado/06/2017 (B/Victoria); A/Kansas/14/2017 (H3N2)) в составе препарата ИСКОМ Матрикс-BQ

**Table 1.** Results of haemagglutination inhibition reactions in serum samples of mice immunised twice intraperitoneally with 7.5 µg or 2 µg of each haemagglutinin of A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09, B/Colorado/06/2017, and A/Kansas/14/2017 (H3N2) influenza strains, adjuvanted with Matrix-BQ

Штамм, использованный в РТГА в качестве антигена <i>Strains used as HI antigens</i>	Значения СГТ антител в образцах сыворотки крови животных, иммунизированных препаратами <i>Serum antibody GMTs in animals immunised with the preparations</i>	
	Матрикс-BQ + 7,5 мкг антигена <sup>а</sup> <i>Matrix-BQ + 7.5 µg antigen<sup>a</sup></i>	Матрикс-BQ + 2 мкг антигена <sup>а</sup> <i>Matrix-BQ + 2 µg antigen<sup>a</sup></i>
A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09 <sup>б</sup>	2425 (3068–1917)	2111 (2671–1668)
A/YANA0/1/2019 (H1N1)pdm0 <sup>с</sup>	5382 (7558–3832)	4525 (6699–3057)
A/Russia/01/2009 (H1N1)pdm09 <sup>с</sup>	3675 (5884–2295)	3200 (4335–2361)
A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09	800 (1393–459)	566 (837–382)
A/Solomon Islands/03/06 (H1N1) <sup>д</sup>	113 (167–76)	57 (84–38)
A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) <sup>д</sup>	<20	<20
A/Kansas/14/2017 (H3N2) <sup>б</sup>	11143 (13503–9195)	14703 (21063–10264)
A/Texas/50/2012 (H3N2)	673 (1289–351)	1600 (2786–919)
A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	2690 (3779–1916)	3805 (5344–2710)
A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	283 (419–191)	400 (696–230)
B/Colorado/06/2017 (B/Victoria) <sup>б</sup>	2414 (3046–1913)	1766 (2759–1130)
B/Brisbane/60/2008 (B/Victoria)	1903 (2672–1355)	2263 (5439–941)
B/Washington/02/2019 (B/Victoria)	226 (335–153)	452 (893–229)
B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata)	<20	<20

*Примечание.* РТГА – реакция торможения гемагглютинации; СГТ – среднее геометрическое титров антител.

<sup>а</sup> Доверительный интервал при  $P=0,95$ .

<sup>б</sup> Гомологичные вакцинные штаммы, использованные при иммунизации.

<sup>с</sup> Изоляты вируса гриппа «дикого» типа, выделенные в культуре клеток MDCK.

<sup>д</sup> Штаммы являются допандемическими.

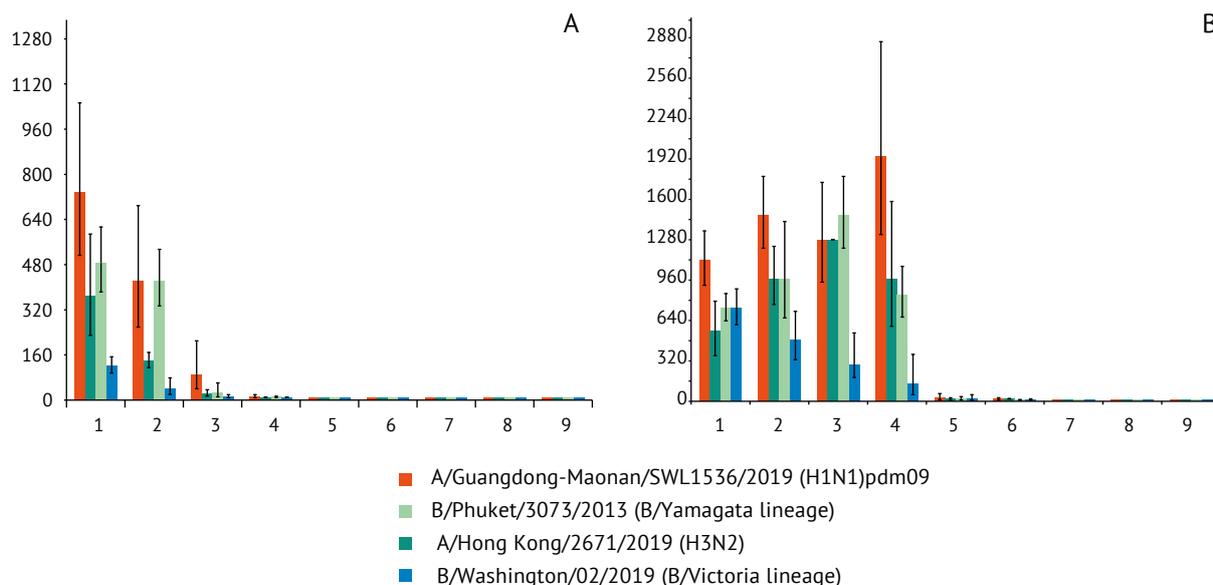
*Note.* HI – haemagglutinin inhibition reaction; GMT – geometric mean antibody titre.

<sup>а</sup> Confidence intervals are at  $P=0.95$ .

<sup>б</sup> Homologous vaccine strains used for immunisation.

<sup>с</sup> Wild-type influenza virus isolates obtained in MDCK.

<sup>д</sup> Prepandemic strains.



**Рис. 4.** Данные реакции торможения гемагглютинации с образцами сыворотки крови иммунизированных внутримышечно мышей, взятыми на 21 (А) и 42 (В) сутки после иммунизации. Ось абсцисс – группы экспериментальных животных: 1 – Матрикс-BQ + 5 мкг антигена; 2 – Матрикс-BQ + 1 мкг антигена; 3 – Матрикс-BQ + 200 нг антигена; 4 – Матрикс-BQ + 50 нг антигена; 5 – 5 мкг антигена; 6 – 1 мкг антигена; 7 – 200 нг антигена; 8 – 50 нг антигена; 9 – Матрикс BQ без антигена (отрицательный контроль). Ось ординат – среднее геометрическое значений обратных титров антител. В легенде указаны антигены вирусов гриппа, использованные для иммунизации. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала при  $P=0,95$ .

**Fig. 4.** Data on haemagglutination inhibition in mouse serum samples taken on days 21 (A) and 42 (B) after intramuscular immunisation. The X-axis shows the experimental animal groups: (1) Matrix-BQ + 5  $\mu\text{g}$  of each antigen; (2) Matrix-BQ + 1  $\mu\text{g}$  of each antigen; (3) Matrix-BQ + 200 ng of each antigen; (4) Matrix-BQ + 50 ng of each antigen; (5) 5  $\mu\text{g}$  of each antigen; (6) 1  $\mu\text{g}$  of each antigen; (7) 200 ng of each antigen; (8) 50 ng of each antigen; (9) the negative control group of Matrix-BQ without antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The legend indicates the influenza virus antigens used for immunisation. Whiskers reflect confidence intervals at  $P=0.95$ .

на рисунке 4В. Значения СГТ антител в образцах сыворотки крови животных из экспериментальных групп, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген: комплексом 1, 0,2 или 0,05 мкг каждого антигена с адьювантом Матрикс-BQ, после повторной иммунизации достоверно ( $P=0,95$ ) выросли против всех четырех использованных антигенов. Наибольший рост значений титров зафиксирован в группе мышей, иммунизированных комплексом 0,05 мкг антигена + Матрикс-BQ, который составил 147, 95, 73 и 24 раза соответственно против A/(H1N1)pdm09, A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2), B/Victoria, B/Yamagata антигенов. В группах животных, внутримышечно иммунизированных препаратами антигенов в дозе 5 и 1 мкг без ИСКОМ адьюванта, не наблюдалось достоверного нарастания значений титров, а в группах, иммунизированных 0,2 и 0,05 мкг, антитела не детектировались в РТГА. Рассматривая вопрос достоверности различий между экспериментальными группами, необходимо отметить, что различия детектировались только между значениями СГТ антител против некоторых антигенов в некоторых группах. То есть в совокупности можно сде-

лать заключение, что при двукратном введении препаратов ИСКОМ-антиген в предложенных концентрациях дозозависимого эффекта не наблюдалось и введение 50 нг антигена вызывает ответ, схожий с ответом на введение 5 мкг.

Результаты оценки выживаемости экспериментальных животных, иммунизированных внутримышечно, инфицированных адаптированным штаммом вируса гриппа A/California/04/09 (H1N1)pdm09, на 42 сут после первой иммунизации представлены на рисунке 5. Гибель животных из группы отрицательного контроля фиксировалась с 4 сут после заражения. На 9 сут 100% животных погибли. Также гибель животных на 8–15 сут после заражения фиксировалась в группе, дважды иммунизированной препаратом без ИСКОМ адьюванта, смесью антигенов по 50 нг гемагглютинаина штаммов A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2), B/Washington/02/2019, B/Phuket/3073/2013. Неожиданно, но в группе животных, иммунизированных дважды препаратом без ИСКОМ адьюванта, содержащим 200 нг каждого гемагглютинаина, притом, что ни у одного животного

не фиксировалось титров антител методом РТГА, гибели мышей не наблюдалось.

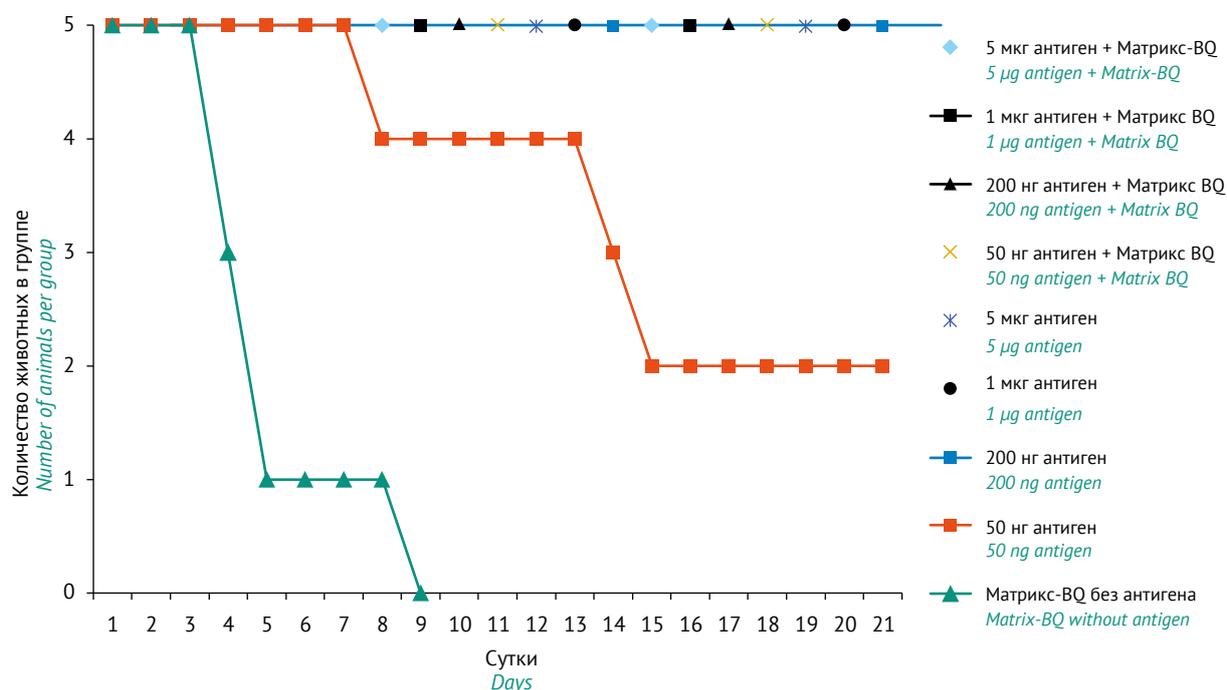
У выживших животных на 27 сут после заражения были отобраны пробы крови, и сыворотка была исследована в РТГА. Значения титров к компоненту A/(H1N1)pdm09 представлены на рисунке 6. Были определены значения титров к исследовавшимся четырем компонентам, но достоверные различия со значениями титров до заражения зафиксированы только для компонента A/(H1N1)pdm09. Для животных, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген в дозе 5 мкг, 1 мкг, 200 нг, 50 нг, имевших высокие титры антител в РТГА перед заражением, характерно снижение титров. На основании статистически достоверных различий ( $P=0,95$ ) можно сделать вывод о том, что в группах мышей, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген: комплексом 5 мкг антигена + Матрикс-BQ и комплексом 50 нг антигена + Матрикс-BQ, падение значений СГТ антител составило 1,52 и 2,3 раза соответственно. В то же время у животных, иммунизированных препаратом без ИСКОМ адьюванта, титры значительно выросли. В группе животных,

иммунизированных препаратом в дозе 50 нг без ИСКОМ адьюванта, выжило 2 животных. В группе отрицательного контроля (Матрикс BQ без антигена) все животные погибли.

### Обсуждение

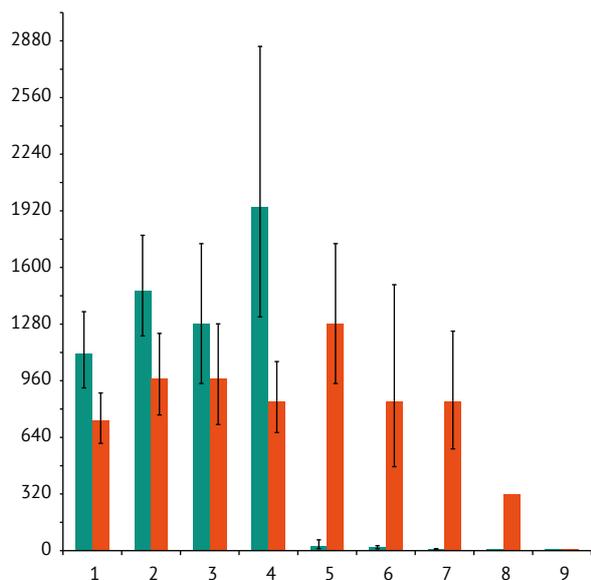
Данные, обсуждаемые в этом исследовании, получены при интраперитонеальной и внутримышечной иммунизации мышей препаратами ИСКОМ-антиген в сравнении с антигенами без ИСКОМ адьюванта. Эти модели дают ряд преимуществ, таких как доступность линейных животных, возможность введения препарата в объеме, рассчитанном исходя из предполагаемого введения человеку, и др. В то же время при внутримышечном введении возможен иной уровень ответа по сравнению с интраперитонеальным, и для этого были изготовлены препараты с небольшим объемом введения.

Растительные сапонины давно известны и применяются в медицине. С развитием иммунологии стали известны уникальные особенности сапонинов, которые обуславливают выраженные адьювантные свойства, в основном



**Рис. 5.** Выживаемость экспериментальных животных, двукратно иммунизированных внутримышечно, после заражения адаптированным штаммом вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1)pdm09. В легенде приведены наименования групп: указана доза каждого гемагглютиниона в смеси штаммов A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2), B/Washington/02/2019, B/Phuket/3073/2013 в комплексе с компонентом ИСКОМ Матрикс-BQ или без него, а также отрицательный контроль – Матрикс-BQ без антигена.

**Fig. 5.** Survival rates of experimental animals infected with mouse-adapted A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 after two intramuscular immunisations. The legend names the study groups, indicating haemagglutinin concentrations of each strain (A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09; A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2); B/Washington/02/2019; B/Phuket/3073/2013) in the mixtures with or without Matrix-BQ, and the negative control group of Matrix-BQ without antigens.



**Рис. 6.** Данные реакции торможения гемагглютинации с образцами сыворотки крови иммунизированных двукратно внутримышечно мышей, инфицированных адаптированным летальным штаммом вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1)pdm09. Ось абсцисс – группы экспериментальных животных: 1 – Матрикс-BQ + 5 мкг антигена; 2 – Матрикс-BQ + 1 мкг антигена; 3 – Матрикс-BQ + 200 нг антигена; 4 – Матрикс-BQ + 50 нг антигена; 5 – 5 мкг антигена; 6 – 1 мкг антигена; 7 – 200 нг антигена; 8 – 50 нг антигена; 9 – Матрикс BQ без антигена (отрицательный контроль). Ось ординат – среднее геометрическое значений обратных титров антител. На гистограмме указаны данные о титрах антител до заражения животных штаммом A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 (■) и после заражения (■). Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала при  $P=0,95$ .

**Fig. 6.** Data on haemagglutination inhibition reactions in mice serum samples after two intramuscular immunisations and infection with the A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 strain adapted and lethal to mice. The X-axis shows the experimental animal groups: (1) Matrix-BQ + 5 µg of each antigen; (2) Matrix-BQ + 1 µg of each antigen; (3) Matrix-BQ + 200 ng of each antigen; (4) Matrix-BQ + 50 ng of each antigen; (5) 5 µg of each antigen; (6) 1 µg of each antigen; (7) 200 ng of each antigen; (8) 50 ng of each antigen; (9) the negative control group of Matrix-BQ without antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The boxes indicate antibody titres to A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 before (■) and after infection (■). Whiskers reflect confidence intervals at  $P=0.95$ .

обусловленные Th1 иммунным ответом [17]. В ходе исследования было установлено, что единообразно стандартизованные и полученные по одной технологии на основе сапонинов Синюхи голубой и Квиллайи мыльной иммуностимулирующие комплексы обладают аналогичными свойствами.

Образцы сыворотки крови, полученные в поле интраперитонеального введения комплексов ИСКОМ с антигенами вируса гриппа, имеют сопоставимые значения титров. Коммерчески доступны сапонины Квиллайи мыльной. Сапо-

нины Синюхи голубой могут быть получены в больших количествах, так как это растение пригодно для промышленного культивирования. Данные адъюванты показали перспективные свойства с точки зрения производственных стратегий, предполагающих рациональное использование антигенов. Даже после однократного интраперитонеального введения, на 28 сут после иммунизации, препараты ИСКОМ-антиген, содержавшие комплексы 0,1 ИМЛД<sub>50</sub> Матрикс-ВР или 0,1 ИМЛД<sub>50</sub> Матрикс-ВQ с 2 мкг гемагглютинаина каждого вакцинного штамма A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09, A/Kansas/14/2017 (H3N2), B/Colorado/06/2017, вызывали достоверное кратное увеличение титров по сравнению с введением антигена (7,5 мкг антигена) без ИСКОМ адъюванта. В экспериментальных работах, проведенных ранее, было показано, что антитела в титре в РТГА более 1:320 к антигену (H1N1)pdm09 способны защищать животное от заражения вирусом гриппа данного подтипа, а значения титров более 1:40 – от гибели [16]. Полученные в этом исследовании результаты свидетельствуют о том, что от летального исхода при заражении адаптированным к мышам штаммом вируса гриппа A/California/04/09 (H1N1)pdm09 защищает иммунизация такими концентрациями антигенов, ответ на которые не фиксируется в РТГА, то есть менее 1:10. Несмотря на то что гриппозные антигены, производимые в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ), могут иметь серологические отличия от эпидемических штаммов и их культуральных изолятов, иммунный ответ, формируемый на двукратное внутримышечное введение таких низких доз антигенов, полученных с использованием РКЭ, как 0,2 мкг, не приводящий к выработке антител в количествах, детектируемых в РТГА, может являться протективным и предотвращать гибель экспериментальных животных при заражении культуральным штаммом вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1)pdm09, прошедшим 8 пассажей на мышях.

После двукратного введения препаратов ИСКОМ-антиген у мышей сформировались такие высокие титры антител в сыворотке крови, уровень которых гипотетически может способствовать формированию стерилизующего иммунитета к вирусам гриппа, при достижении которого можно было бы стремиться к эрадикации гриппа наравне с корью и полиомиелитом при широком распространении такого типа вакцин. Это требует подтверждения в экспериментах с использованием более крупных животных, у которых возможно взятие назальных смывов для количественных исследований репликации вируса.

Можно предположить возможность рассмотрения вопроса об универсальной гриппозной вакцине. В настоящее время под универсальной вакциной в основном понимают препарат равноэффективный в отношении всех вирусов гриппа в течение продолжительного периода времени. Для этих целей рассматривают возможность иммунизации высококонсервативными компонентами вириона – матриксным белком или нуклеопротеином [18]. Серологический анализ, проведенный нами в данном исследовании, показывает, что при использовании препаратов ИСКОМ-антиген антитела имеют кросс-реактивность к циркулировавшим ранее штаммам гриппа на протективном уровне. Наиболее ярким свидетельством этого является то, что значения СГТ антител к допандемическому штамму A/Solomon Islands/03/06 (H1N1) при двукратной интраперитонеальной иммунизации антигенами, входившими в вакцину сезона 2019–2020 гг., составили 113,2 (167,5–76,5) и 56,6 (83,7–38,2) для групп животных, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген: комплексами 7,5 и 2 мкг каждого антигена и 0,1 ИМЛД<sub>50</sub> Матрикс-BQ соответственно. Эти значения статистически неразличимы со значениями титров антител к использовавшемуся при иммунизации штамму A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09 на 28 сут в группе животных, однократно интраперитонеально иммунизированных вакциной в дозе 7,5 мкг. Штаммы разделяет не только 12-летний интервал циркуляции, но и то, что предшественник A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09 в это время циркулировал в популяциях свиней.

Также заслуживает внимания факт, что образцы сыворотки крови мышей, полученные при иммунизации компонентом вакцины B/Colorado/06/2017 (B/Victoria), имеют значения СГТ антител к штамму B/Brisbane/60/2008 (Victoria) в интервале 1:1902,7–1:2262,7 в зависимости от группы животных, и эти титры статистически неразличимы ( $P=0,95$ ) в сравнении с титрами к гомологичному штамму B/Colorado/06/2017 (B/Victoria). Для исследованных негомологичных штаммов подтипа H3N2 значения СГТ антител были ниже по сравнению со значениями титров в РТГА со штаммом A/Kansas/14/2017 (H3N2), использовавшимся при иммунизации, но они также позволяют говорить не только о протективном, но и, вероятно, стерилизующем иммунитете для временного интервала 10 лет.

Отдельно стоит обратить внимание на данные по кросс-реактивности полученных сывороток с изолятами вируса гриппа «дикого» типа, выделенными на клеточной культуре MDCK.

Для исследованных в этой работе антигенов штаммов A/(H1N1)pdm09 нет достоверных различий между образцами, полученными в РКЭ, и культуральными изолятами, циркулировавшими 11 лет назад (табл. 1). В Российской Федерации производство инактивированных гриппозных вакцин основано на культивировании штаммов-продуцентов в РКЭ. За счет адаптации к клеткам птиц вирус изменяется, и после иммунизации наблюдается снижение кросс-реактивности с изолятами вируса гриппа «дикого» типа. Анализ образцов сыворотки крови, полученных в этом исследовании при иммунизации мышей антигенами, полученными в РКЭ, в составе комплекса ИСКОМ-антиген, показал, что между значениями СГТ, определенными при постановке РТГА с использованием штаммов-продуцентов, адаптированных к РКЭ, и «диких» культуральных изолятов подтипа A/(H1N1)pdm09 не выявляется статистически достоверных различий. Эти данные сопоставимы с аналогичными результатами, полученными ранее [19, 20].

### Заключение

В результате выполнения данной работы создана лабораторная технология получения ИСКОМ адъювантов с использованием сапонинов Синюхи голубой и Квиллайи мыльной. Структура препаратов была изучена с помощью электронной микроскопии, установлена идентичность ИСКОМ адъюванта Матрикс-BQ адъюванту Matrix-M (Novavax, США). Исследование биологических свойств показало, что полученные нами препараты аналогичны адъювантам, используемым в производстве вакцины против COVID-19 NVX-CoV2373 и гриппозной вакцины NanoFlu (Novavax, США).

Результатом внедрения ИСКОМ адъювантов Матрикс-BQ и Матрикс-BP может стать существенное снижение потребности в антигенах вирусов при производстве вакцин. Опираясь на полученные данные, можно высказать предположение, что при использовании Матрикс-BP и Матрикс-BQ или аналогичных адъювантов возможно достигнуть экономии антигенов в 15–30 раз для препаратов, вводимых однократно, и 150–300 раз для препаратов, вводимых двукратно и более. Эффективность использования препаратов Матрикс-BP и Матрикс-BQ в разработке вакцин для профилактики инфекционных заболеваний, показанная в нашем исследовании, позволяет считать целесообразным рассмотрение возможности их применения также и при разработке иммунокорректирующих препаратов.

## Литература/References

1. Morein B, Sundquist B, Höglund S, Dalsgaard K, Osterhaus A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*. 1984;308(5958):457–60. <https://doi.org/10.1038/308457a0>
2. Villacres MC, Behboudi S, Nikkila T, Lovgren-Bengtsson K, Morein B. Internalization of Iscom-borne antigens and presentation under MHC class I or class II restriction. *Cellular Immunology*. 1998;185(1):30–8. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1278>
3. Cibulski SP, Mourglia-Ettlin G, Teixeira TF, Quirici L, Roehe PM, Ferreira F, Silveira F. Novel ISCOMs from *Quillaja brasiliensis* saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine*. 2016;34(9):1162–71. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.029>
4. den Brok MH, Büll C, Wassink M, de Graaf AM, Wagenaars JA, Minderman M, et al. Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation. *Nat Commun*. 2016;7:13324. <https://doi.org/10.1038/ncomms13324>
5. Marty-Roix R, Vladimer GI, Pouliot K, Weng D, Buglione-Corbett R, West K, et al. Identification of QS-21 as an inflammasome-activating molecular component of saponin adjuvants. *J Biol Chem*. 2016;291(3):1123–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683011>
6. Barr IG, Mitchell GF. ISCOMs (immunostimulating complexes): the first decade. *Immunol Cell Biol*. 1996;74(1):8–25. <https://doi.org/10.1038/icb.1996.2>
7. Черникова МИ, Васильев ЮМ. Вакцины против гриппа с иммуoadъювантами: данные прямых сравнительных исследований. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015;(5):88–102. [Chernikova MI, Vasiliev YuM. Adjuvanted influenza vaccines: data from direct comparative studies. *Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2015;(5):88–102 (In Russ.)]
8. Shinde V, Cho I, Plested JS, Agrawal S, Fiske J, Cai R, et al. Comparison of the safety and immunogenicity of a novel Matrix-M-adjuvanted nanoparticle influenza vaccine with a quadrivalent seasonal influenza vaccine in older adults: a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(1):73–84. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00192-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00192-4)
9. Keech C, Albert G, Cho I, Robertson A, Reed P, Neal S, et al. Phase 1-2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *N Engl J Med*. 2020;383:2320–32. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2026920>
10. Лioзнов ДА, Харит СМ, Ерофеева МК, Зубкова ТГ, Горчакова ОВ, Николаенко СЛ. Оценка реактогенности и иммуногенности вакцины гриппозной четырехвалентной инактивированной субъединичной. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018;17(3):57–62. [Lioznov DA, Kharit SM, Erofeeva MK, Zubkova TG, Gorchakova OV, Nikolaenko SL. Assessment of reactogenicity and immunogenicity of the quadrivalent live attenuated influenza vaccine. *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2018;17(3):57–62 (In Russ.)] <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-3-57-62>
11. Никифорова АН, Миронов АН, Бушменков ДС, Меркулов ВА, Степанов НН. Безопасность и иммуногенность инактивированной гриппозной вакцины с адъювантом совидон производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2011;(2):30–4. [Nikiforova AN, Mironov AN, Bushmenkov DS, Merkulov VA, Stepanov NN. Safety and immunogenicity of inactivated influenza vaccine associated with sovidon, developing by «Microgen». *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2011;(2):30–4 (In Russ.)]
12. Ko EJ, Kang SM. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14(12):3041–5. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1495301>
13. Evseenko VA, Gudymo AS, Danilchenko NV, Onkhonova GS, Vu LT, Ryzhikov AB. Saponins extracted from *Polemanium caeruleum* have adjuvant activity in guinea pig intranasal immunization with trivalent influenza antigens. *Frontiers Drug Chemistry Clinical Res*. 2020;3:1–5. <https://doi.org/10.15761/FDC-CR.1000142>
14. El Barky AR, Hussein SA, Alm-Eldeen AA, Hafez YA, Mohamed TM. Anti-diabetic activity of *Holothuria thomasi* saponins. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:1472–87. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.002>
15. Ашмарин ИП, Воробьев АА. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Л.: Медгиз; 1962. [Ashmarin IP, Vorob'ev AA. *Statistical methods in microbiological research*. Leningrad: Medgiz; 1962 (In Russ.)]
16. Evseenko VA, Kolosova NP, Gudymo AS, Maltsev SV, Bulanovich JA, Goncharova NI, et al. Intranasal immunization of guinea pig with trivalent influenza antigen adjuvanted by *Cyclamen europaeum* tubers extract. *Arch Virol*. 2019;164(1):243–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4023-3>
17. Song X, Hu S. Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs. *Vaccine*. 2009;27(36):4883–90. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.033>
18. Nguyen QT, Choi YK. Targeting antigens for universal influenza vaccine development. *Viruses*. 2021;13(6):973. <https://doi.org/10.3390/v13060973>
19. Cox F, Saeland E, Baart M, Koldijk M, Tolboom J, Dekking L, et al. Matrix-M™ adjuvation broadens protection induced by seasonal trivalent virosomal influenza vaccine. *Virol J*. 2015;12:210. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0435-9>
20. Rimmelzwaan GF, Baars M, van Beek R, de Lijster P, de Jong JC, Claas EC, Osterhaus AD. Influenza virus subtype cross-reactivities of haemagglutination inhibiting and virus neutralising serum antibodies induced by infection or vaccination with an ISCOM-based vaccine. *Vaccine*. 1999;17(20–21):2512–6. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00063-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00063-8)

**Вклад авторов.** **В.А. Евсеенко** — разработка технологии и получение иммуностимулирующих вирусоподобных комплексов, существенный вклад в концепцию и дизайн работы; анализ, интерпретация результатов работы, написание текста рукописи; **А.С. Гудымо** — комплекс экспериментальных работ с лабораторными животными; **Н.В. Данильченко** — комплекс экспериментальных работ с лабораторными животными; **С.В. Святченко** — наработка и подготовка вируса гриппа, адаптированного к мышам, написание текста рукописи; **О.С. Таранов** — проведение комплекса электронно-микроскопических исследований; **А.Б. Рыжиков** — утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

**Соответствие принципам этики.** Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен Биоэтической комиссией № 1 при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол ГНЦ ВБ «Вектор»/03-04.2021).

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1665). Комплекс серологических исследований в данной работе был выполнен старшим научным сотрудником отдела зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Дурымановым Александром Гавриловичем (1951–2021).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Authors' contributions.** **V.A. Evseenko**—development of the production technology and production of the immune-stimulating virus-like complexes, a significant contribution to the concept and design of the work, analysis and interpretation of the results of the work, drafting of the manuscript; **A.S. Gudymo**—experimental work with laboratory animals; **N.V. Danilchenko**—experimental work with laboratory animals; **S.V. Svyatchenko**—development and preparation of the influenza virus adapted to mice, drafting of the manuscript; **O.S. Taranov**—electron microscopic studies; **A.B. Ryzhikov**—approval of the final version of the article for publication.

**Ethics approval.** The animal study protocol was approved by Bioethics Committee No. 1 of the SRC VB “Vector” (approval No. 03-04.2021).

**Acknowledgements.** This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2019-1665).

The serologic studies reported in this article were performed by Alexander G. Durymanov (1951–2021), senior research scientist, Department of zoonotic diseases and influenza, SRC VB “Vector”.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Об авторах / Authors

**Евсеенко Василий Александрович**, канд. биол. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6720-1040>  
[evseenko\\_va@vector.nsc.ru](mailto:evseenko_va@vector.nsc.ru)

**Гудымо Андрей Сергеевич**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6952-6412>  
[gudymo\\_as@vector.nsc.ru](mailto:gudymo_as@vector.nsc.ru)

**Данильченко Наталья Викторовна**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2655-4629>  
[daniilchenko\\_nv@vector.nsc.ru](mailto:daniilchenko_nv@vector.nsc.ru)

**Святченко Светлана Викторовна**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4573-5783>  
[svyatchenko\\_sv@vector.nsc.ru](mailto:svyatchenko_sv@vector.nsc.ru)

**Таранов Олег Святославович**, канд. биол. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>  
[taranov@vector.nsc.ru](mailto:taranov@vector.nsc.ru)

**Рыжиков Александр Борисович**, канд. биол. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7009-0748>  
[ryzhik@vector.nsc.ru](mailto:ryzhik@vector.nsc.ru)

**Vasily A. Evseenko**, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6720-1040>  
[evseenko\\_va@vector.nsc.ru](mailto:evseenko_va@vector.nsc.ru)

**Andrey S. Gudymo**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6952-6412>  
[gudymo\\_as@vector.nsc.ru](mailto:gudymo_as@vector.nsc.ru)

**Natalia V. Danilchenko**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2655-4629>  
[daniilchenko\\_nv@vector.nsc.ru](mailto:daniilchenko_nv@vector.nsc.ru)

**Svetlana V. Svyatchenko**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4573-5783>  
[svyatchenko\\_sv@vector.nsc.ru](mailto:svyatchenko_sv@vector.nsc.ru)

**Oleg S. Taranov**, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>  
[taranov@vector.nsc.ru](mailto:taranov@vector.nsc.ru)

**Aleksandr B. Ryzhikov**, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7009-0748>  
[ryzhik@vector.nsc.ru](mailto:ryzhik@vector.nsc.ru)

Поступила 13.10.2021

После доработки 05.05.2022

Принята к публикации 10.06.2022

Received 13 October 2021

Revised 5 May 2022

Accepted 10 June 2022