

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-69-74

УДК 616.98:579.842.23+616.98:579.88

П.Х. Копылов, С.В. Дентовская

Прямое количественное определение белковых антигенов в препаратах субъединичных чумных и риккетсиозных вакцин

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», р.п. Оболенск, Российская Федерация

Цель работы – предложить методические приемы прямого количественного определения специфических белковых антигенов *Yersinia pestis* и *Rickettsia raoultii* в препаратах и различных прототипах субъединичных вакцин. **Материалы и методы.** В качестве модельных использовали антигены *Y. pestis* LcrV и CafI, заключенные в субстанцию вакцины чумной молекулярной микроинкапсулированной (ВЧММ) и отдельно, в микрокристаллы аминокислот, соосажденных с белками чумного микроба. Антигены *R. raoultii* Adr2, OmpB24, YbgF адсорбировали прототипом субстанции риккетсиозной вакцины. Освобождение чумных антигенов из микрокапсул ВЧММ проводили последовательной обработкой последних органическими растворителями метиленхлоридом и метанолом соответственно, микрокристаллы-носители растворяли 0,1 М натрий-цитратным буфером, pH 6,0. Антигены в прототипе субстанции риккетсиозной вакцины определяли измерением количества белков, не связывающихся с алюмогелем. Количественные параметры, характеризующие содержание антигенов в субстанциях и прототипах вакцинных препаратов, вычисляли в результате обработки цифровых изображений полиакриламидных гелей, полученных электрофорезом фракций белковых антигенов, экстрагированных из носителей. **Результаты и обсуждение.** Изучены не вызывающие деградацию белка способы прямой экстракции и последующего количественного анализа антигенов *Y. pestis* LcrV и CafI из препаратов субъединичных вакцин на основе микрокристаллов аминокислот и полилактидных микрокапсул. Установлен различный характер связывания LcrV и CafI в субстанциях микрокристаллов, при этом количественно определена доля антигенов, освобождающихся из микрокристаллов только в результате их полного растворения. Выявлено, что при низких концентрациях белков LcrV и CafI, экстрагированных из микрокристаллов, для их уверенной визуализации необходимо концентрирование экстрактов с последующим удалением солей. Подтверждено, что 10 мкг чумных антигенов и белков *R. raoultii* в объеме дозы введения 200 мкл суспензии достаточно для количественного анализа электрофоретическим методом. Обсуждаются перспективы альтернативных прямой экстракции антигенов иных физико-химических методов оценки состава и качества вакцинных препаратов.

Ключевые слова: вакцины, адъюванты, *Yersinia pestis*, LcrV, CafI, микрокристаллы, экстракция, *Rickettsia raoultii*, Adr2, OmpB24, YbgF.

Корреспондирующий автор: Копылов Павел Христофорович, e-mail: info@obolensk.org.

Для цитирования: Копылов П.Х., Дентовская С.В. Прямое количественное определение белковых антигенов в препаратах субъединичных чумных и риккетсиозных вакцин. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 4:69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-69-74

Поступила 16.12.2022. Принята к публ. 23.12.2022.

P.Kh. Kopylov, S.V. Dentovskaya

Direct Quantification of Protein Antigens in Subunit Plague and Rickettsial Vaccine Preparations

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to put forward the methods for direct quantitative determination of the content of *Yersinia pestis* and *Rickettsia raoultii* protein antigens in preparations and various prototypes of subunit vaccines. **Materials and methods.** *Y. pestis* LcrV and CafI antigens enclosed in the substance of the molecular microencapsulated plague vaccine (MMPV) and separately, in microcrystals of amino acids co-precipitated with plague proteins were used as model antigens. *R. raoultii* Adr2, OmpB24, and YbgF antigens were adsorbed on the prototype substance of the rickettsial vaccine. The release of plague antigens from MMPV microcapsules was carried out through successive treatment of the latter with organic solvents, methylene chloride and methanol, respectively; the carrier microcrystals were dissolved in 0.1 M sodium citrate buffer at pH 6.0. The antigen content in the prototype substance of the rickettsial vaccine was determined by measuring the amount of proteins not bound to the alumogel. Quantitative parameters characterizing the content of antigens in the substances and prototypes of vaccine preparations were calculated by processing digital images of polyacrylamide gels obtained by electrophoresis of protein antigen fractions extracted from carriers. **Results and discussion.** Methods for direct extraction and subsequent quantitative analysis of *Y. pestis* LcrV and CafI antigens from subunit vaccine preparations based on amino acid microcrystals and polylactide microcapsules that do not cause protein degradation have been studied. A different nature of the binding of LcrV and CafI in the substances of microcrystals has been established, while the proportion of antigens released from microcrystals has been quantified only in case of their complete dissolution. It was found that at low concentrations of LcrV and CafI proteins extracted from microcrystals, it is necessary to concentrate the extracts with subsequent removal of salts for their reliable visualization. It has been confirmed that 10 µg of plague antigens and proteins of *R. raoultii* in a dose volume of 200 µl of suspension is sufficient for quantitative analysis using electrophoretic method. The prospects of other physicochemical methods alternative to direct extraction of antigens for evaluating the composition and quality of vaccine preparations are discussed.

Key words: vaccines, adjuvants, *Yersinia pestis*, LcrV, CafI, microcrystals, extraction, *Rickettsia raoultii*, Adr2, OmpB24, YbgF.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The work was carried out within the framework of the Rospotrebnadzor research program for 2021–2025 “Scientific support of epidemiological surveillance and sanitary protection of the territory of the Russian Federation. Creation of new technologies, means and methods of control and prevention of infectious and parasitic diseases”.

Corresponding author: Pavel Kh. Kopylov, e-mail: info@obolensk.org.

Citation: Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V. Direct Quantification of Protein Antigens in Subunit Plague and Rickettsial Vaccine Preparations. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 4:69–74. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-69-74

Received 16.12.2022. **Accepted** 23.12.2022.

Kopylov P.Kh., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1345-2033>

Dentovskaya S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1996-8949>

Вакцинация препаратами на основе инактивированных или аттенуированных микроорганизмов остается одним из наиболее эффективных методов профилактики инфекционных заболеваний. Введение в организм человека всей совокупности антигенов, присутствующих в такого рода препаратах, обуславливает проблему их безопасного применения и использования в качестве универсальных платформ для разработки. Субъединичные вакцины, несущие только основные иммунодоминантные компоненты, позволяют в значительной степени снимать вопросы безопасности. Снижение общего числа антигенов в вакцине уменьшает общую нагрузку на иммунную систему человека, но в то же время утрата целого ряда антигенов с меньшей протективностью сказывается на иммунологической эффективности таких вакцин. Снижение протективности субъединичных вакцин в значительной мере компенсируется введением в препарат иммуностимулирующих агентов (адъювантов). Современные адъюванты могут значительно повышать эффективность иммунного ответа за счет оптимизации размера и формы частиц вакцинного препарата, сохранения нативной структуры антигенов и за счет препятствования термоинактивации [1, 2]. Вместе с тем упрощенный по своей природе антигенный состав субъединичных вакцин подчеркивает важность количественной оценки иммунодоминантных антигенов в вакцинной субстанции, что позволяет контролировать дозирование препарата и проводить мониторинг технологического процесса его получения. Разработка вакцин – это длительный многоэтапный процесс с экспериментальными исследованиями, контролем качества производства, включая нормативно-правовые вопросы, маркетинг и продажи. Краеугольным камнем в разработке вакцин является наличие панели высококачественных тестов и методов, которые позволяют снижать риски получения некачественного продукта как на этапах разработки, клинических испытаний, лицензирования, так и выпуска коммерческого препарата. В итоге все вакцинные препараты должны соответствовать требованиям нормативной документации, касающимся доказательного состава препаратов, в том числе и количественного определения в них присутствующих белковых антигенов [3]. Недавно, например, опубликован всесторонний обзор комплекса методов и подходов *in vivo* и *in vitro*, исполь-

зуемых для контроля различных стадий производства и самого конечного продукта – оральной холерной бивалентной химической вакцины [4]. **Цель** нашей работы – предложить методические приемы прямого количественного определения специфических белковых антигенов *Yersinia pestis* и *Rickettsia raoultii* в препаратах и различных прототипах субъединичных вакцин с учетом проблем и перспектив контроля качества на этапах разработки средств специфической профилактики инфекционных заболеваний.

Материалы и методы

Реагенты. Для приготовления гелей, буферных растворов в процессе растворения микрокристаллов и микрокапсул применяли отечественные реактивы категории «осч», «хч» и импортные, соответствующие им по чистоте.

Источники антигенов. Антигены *Y. pestis* LcrV и CafI выделяли и характеризовали, как описано соответственно в работах [5, 6]. Белки Adr2, OmpB24 и YbgF выделяли никель-хелатной хроматографией на колонках HisTrap HP, 5 ml (Cytiva) с учетом рекомендаций производителя из лизатов рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*, несущих гены *adr2*, *ompB24* и *ybgF* из штамма *R. raoultii* «Караганда 7/98» в плазмиде pET32b(+), любезно предоставленных М.Е. Платоновым.

Адсорбция антигенов суспензией гидроокиси алюминия (алюмогеля). Антигены, предварительно диализованные против забуференного изотонического раствора (ЗФР), содержащего 10 мМ двузамещенного фосфата натрия, 1,76 мМ однозамещенного фосфата калия, 2,7 мМ хлористого калия, 137 мМ хлористого натрия, pH 7,2, стерилизовали, пропуская через стерильные мембранные PES-фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Whatman), и смешивали со стерильной суспензией геля гидроокиси алюминия (A8222, Sigma) в физрастворе. Оба компонента суспензии предварительно стерилизовали автоклавированием при 0,5 атм в течение 30 мин. Суспензии антигенов с гидроокисью алюминия тщательно перемешивали и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Контрольные пробы получали из эквивалентных объемов растворов, не содержащих алюмогель. Пробы для электрофореза готовили из надосадочных фракций отобранных аликвот после центрифугирования.

Экстракция антигенов из полилактидных микрокапсул. Экстракцию антигенов и количественный анализ LcrV и CafI таких микрокапсул, составляющих основу субъединичной чумной вакцины, проводили так, как предложено нами в нормативной документации на вакцину чумную молекулярную микроинкапсулированную (ВЧММ) (регистрационное удостоверение № ЛП-004808 от 19.04.2018).

Освобождение (экстракция) антигенов из микрокристаллов, образованных быстрым осаждением белков с аминокислотами. Препараты микрокристаллов, нагруженных отдельно антигенами LcrV и CafI, получали по методу, изложенному в статье S. Jones *et al.* [7]. Высушенные в течение ночи при комнатной температуре субстанции хранили при 4 °С. Для экстракции белков из нагруженных микрокристаллов использовали методику, описанную в той же статье, измененную с учетом массы сухой субстанции. Готовили навески микрокристаллов, нагруженных антигенами LcrV или CafI, массой около 10 мг в микропробирках и суспендировали их в 1 мл 3ФР в течение 1 мин при комнатной температуре, после чего суспензии центрифугировали 3 мин при 12000g. Отбирали пробы надосадочных фракций в объеме 800 мкл, осторожно удаляли из микропробирок оставшийся 3ФР и вносили по 1 мл 0,1 М раствора цитрата натрия, pH 6,0. Растворение навесок проводили в течение 1 ч при 37 °С с периодическим встряхиванием на вортексе V-32 (BioSan) со скоростью вращения 2500 об/мин, после чего повторяли центрифугирование в тех же условиях и проводили отбор проб. К оставшимся осадкам вновь прибавляли по 1 мл 0,1 М раствора цитрата натрия (pH 6,0) и продолжали их растворение и отбор проб, как описано выше; во второй порции цитрата осадки растворялись полностью. До начала анализа пробы хранили замороженными при минус 20 °С.

Количественное определение антигенов. Количество антигенов в предварительно концентрированных пробах определяли по результатам их электрофореза в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) в восстанавливающих условиях [8]. Для увеличения концентраций белков в анализируемых образцах и их последующей визуализации в гелях пробы обрабатывали следующим образом. К 800 мкл проб добавляли по 200 мкл 80 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и оставляли микропробирки в холодильнике на ночь с целью образования осадка, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 20000g и 4 °С и помещали на лед. Надосадочную часть осторожно удаляли и добавляли к пробам по 1 мл 90 % водного раствора ацетона, охлажденного до минус 20 °С, инкубировали в течение 1 ч в морозильной камере, после чего центрифугировали при тех же условиях. Растворитель декантировали и повторяли процедуру промывки ацетоном еще раз для удаления остатков ТХУ, микропробирки подсушивали на лабораторном столе 3–4 мин. Для растворения осажденных ТХУ и ацетоном белков применяли буфер Laemmli в объеме

60 мкл, содержащий 120 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 20 % глицерина, 10 % 2-меркаптоэтанола, 4 % додецилсульфата натрия и 0,004 % бромфенолового синего. Пробы прогревали в течение 5 мин при 95 °С, встряхивали на вортексе и после образования конденсата при комнатной температуре кратко, в течение 0,5 мин, центрифугировали. Концентрированные таким образом белки в буфере Laemmli использовали для электрофореза. Гели окрашивали кумасси G-250 и получали цифровые изображения на сканере ImageQuant 800 (Amersham), денситометрический анализ окрашенных полос проводили программой GenAnalyser 2010, в качестве калибровки использовали образцы альбумина с различными концентрациями и маркеры молекулярных масс LMW (Cytiva) с заявленными массовыми долями компонентов.

Результаты и обсуждение

Задача экстрагирования белков, прочно адсорбированных частицами гидроокиси алюминия, ограничивала применение жестких агентов, вызывающих необратимую деградацию полипептидной цепи антигенов. Экспериментально найденные более мягкие экстрагенты, такие как буферные растворы с различными детергентами, с высокими/низкими значениями pH, хаотропными агентами, часто освобождали белки в недостаточной степени, при этом значительно усложняя последующие процедуры необходимостью своего удаления из аналитов. Поэтому задачу определения антигенов в составе вакцины часто решают от противного – измерением количества антигенов, не связывающихся с алюмогелем. Необходимо отметить, что такой метод может быть использован только при адсорбции антигенов, то есть в процессе приготовления вакцинных препаратов, и не применим для готовых субстанций на основе гидроокиси алюминия. Итоги сорбции использованных нами различных антигенов частицами гидроокиси алюминия иллюстрирует рис. 1. Сравнение линий 1 и 2 этого рисунка показало неполную адсорбцию антигенов LcrV и CafI в приготовленном препарате, связывание составляло соответственно 43 и 30 %. В то же время очищенные рекомбинантные белки риккетсий Adr2 и YbgF полностью адсорбировались; в значительной степени (90 %) также адсорбирован белок OmpB24 таким же количеством гидроокиси алюминия, как и в случае белков чумного микроба (рис. 1, линии 4, 8 и 6). Видно, что использование одинаковых массовых соотношений различных антигенов и алюмогеля выдает вариативность их адсорбционных способностей в отношении сорбента, обусловленных в конечном итоге топографией заряженных и гидрофобных участков, то есть аминокислотными последовательностями антигенов. Из рис. 1 следует, что задача контроля поведения антигенов на этапе их адсорбции гидроокисью алюминия может быть успешно решена для диапазона концентраций используемых в экспериментальных прототипах вакцинных пре-

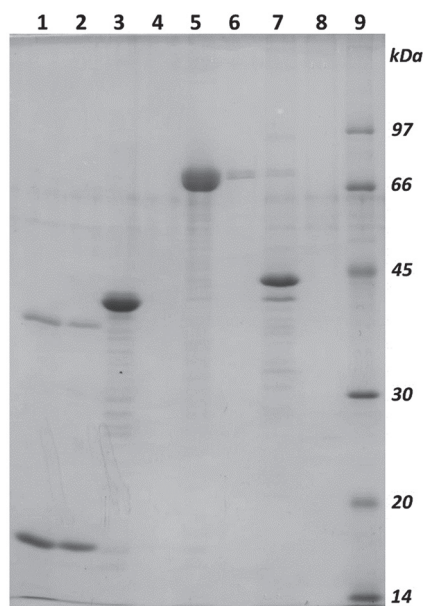


Рис. 1. Электрофорез очищенных белков LcrV, CafI, Adr2, OmpB24 и YbgF после адсорбции в суспензии гидроксида алюминия:

линии 1, 2 – LcrV и CafI; 3, 4 – Adr2; 5, 6 – OmpB24; 7, 8 – YbgF; 1, 3, 5, 7 – неадсорбированные белки в контрольных препаратах; 2, 4, 6, 8 – надосадочные фракции суспензий гидроксида алюминия; 9 – маркеры молекулярных масс белков, Cytiva, # 17044601 (сверху вниз, кДа – 97, 66, 45, 30, 20, 14)

Fig. 1. Electrophoresis of purified proteins LcrV, CafI, Adr2, OmpB24, and YbgF after adsorption in a suspension of aluminum hydroxide:

lanes 1, 2 – LcrV and CafI; 3, 4 – Adr2; 5, 6 – OmpB24; 7, 8 – YbgF; 1, 3, 5, 7 – non-adsorbed proteins in control preparations; 2, 4, 6, 8 – supernatant fractions of suspensions of aluminum hydroxide; 9 – protein molecular weight markers, “Cytiva”, # 17044601 (from top to bottom, kDa – 97, 66, 45, 30, 20, 14)

паратов (одна доза суспензии для введения мышам составляла 200 мкл, содержала 10 мкг антигена и визуализировалась на электрофореграмме).

В экспериментах с микрокристаллами, полученными по методу S. Jones *et al.* [7], нагруженными отдельно антигенами LcrV и CafI, использован мягкий метод их растворения в цитратном буфере, который сохранял антигены, заключенные в микрокристаллы, и давал возможность проведения дальнейшего анализа освобожденных белков. В оригинальной методике количественное определение проводили иммуноферментным анализом с использованием соответствующих специфических антител и антивидовых конъюгатов [7]. Мы использовали электрофорез и денситометрию гелей, что исключало получение и использование специфических антител, однако из-за меньшей чувствительности метода ДСН-ПААГ применяли концентрирование образцов с необходимым исчерпывающим удалением ТХУ и цитрата, которые могли сильно исказить электрофореграммы.

Приведена электрофореграмма параллельной экстракции LcrV и CafI из четырех одинаковых навесок нагруженных микрокристаллов (рис. 2). Анализ показал, что часть LcrV (16,1 %) и CafI (25,2 %) переходила в растворимое состояние в ЗФР в течение 1 мин, последующая часовая экстракция 0,1 М цитратом освобождала из микрокристаллов

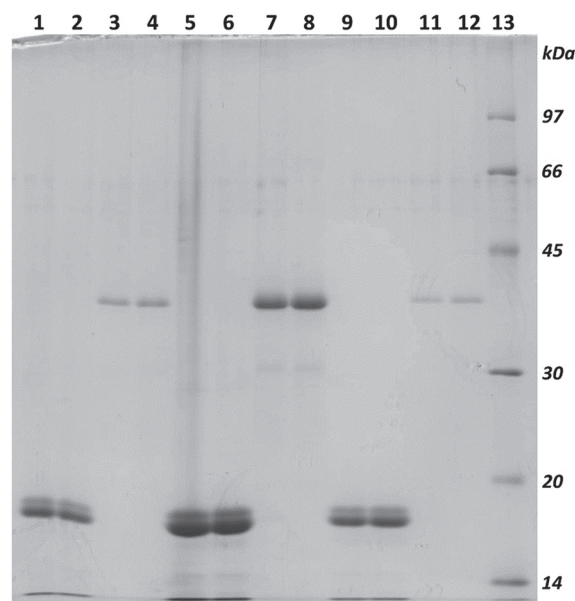


Рис. 2. Электрофорез экстрактов микрокристаллов, нагруженных антигенами LcrV и CafI отдельно:

линии 1, 2, 5, 6, 8, 9 – экстракты микрокристаллов с CafI; 3, 4, 7, 8, 11, 12 – экстракты микрокристаллов с LcrV; 1, 2, 3, 4 – экстракция физраствором; 5, 6, 7, 8 – первая экстракция 0,1 М цитратом, pH 6,0; 9, 10, 11, 12 – вторая экстракция 0,1 М цитратом, pH 6,0; 13 – маркеры молекулярных масс белков, Cytiva, # 17044601 (сверху вниз, кДа – 97, 66, 45, 30, 20, 14)

Fig. 2. Electrophoresis of microcrystal extracts loaded with LcrV and CafI antigens separately:

lanes 1, 2, 5, 6, 8, 9 – extracts of microcrystals with CafI; 3, 4, 7, 8, 11, 12 – extracts of microcrystals with LcrV; 1, 2, 3, 4 – saline extraction; 5, 6, 7, 8 – first extraction with 0.1 M citrate, pH 6.0; 9, 10, 11, 12 – second extraction with 0.1 M citrate, pH 6.0; 13 – protein molecular weight markers, “Cytiva”, # 17044601 (from top to bottom, kDa – 97, 66, 45, 30, 20, 14)

соответственно 75,2 и 49,2 % этих антигенов, вторая экстракция тем же буфером завершала растворение носителя и освобождала оставшиеся антигены – 8,7 и 25,6 % соответственно (рис. 2). Представленный анализ позволял сравнить эффективность различных вариантов адсорбции LcrV и CafI микрокристаллами, определить содержание антигенов в 1 мг сухой субстанции, долю легкорастворимых белков в препаратах и рассчитать массы смешиваемых микрокристаллов с эквивалентным содержанием антигенов, а также число доз прототипа препарата для иммунизации животных.

Анализ прямого определения антигенов LcrV и CafI в полилактидных микрокапсулах препарата ВЧММ детально изложен в соответствующей нормативной документации и аналогичен представленному выше с теми отличиями, что полимерный носитель последовательно обрабатывали не цитратом, а органическими растворителями, удаляли их и растворяли содержимое вакцинных флаконов в электрофоретическом буфере Laemmli. Экспериментально установили, что органические контаминанты полилактидной матрицы образцов не влияли на качество гелей. Результаты использовали для нормативного количественного контроля антигенов в препаратах ВЧММ.

Разработка вакцины – сложная задача. Часто для разработки вакцины недостаточно научных знаний о

молекулярных механизмах ее защитного действия, что затрудняет увязку определенного компонента с конкретными характеристиками продукта и существенно затрудняет разработку соответствующих анализов для контроля качества вакцины. Кроме того, большое разнообразие патогенов также порождает значительные различия в технологии производства вакцин [9]. В результате каждая вакцина нуждается в индивидуальном наборе тестов для определения ее качества. Текущие нормативные требования к биофармацевтическим продуктам хорошо обобщены в руководствах Международной конференции по гармонизации [10].

Рассматривая прототипы вакцинных препаратов на основе носителей-адъювантов различной химической природы, можно заключить, что возможность прямого анализа их антигенного содержимого традиционными методами, включающими экстракцию и последующий анализ, определяется прочностью связей между белковыми антигенами и матрицей. В случае практически необратимого связывания количественный контроль антигена возможен главным образом на этапе изготовления. В противоположном случае возможно специфическое разрушение носителей в мягких условиях с сохранением антигенов либо радикальное ослабление межмолекулярных сил, удерживающих антиген, с его последующей диффузией в растворимую фазу и идентификация количественными иммунохимическими (ИФА, иммунохроматография), физико-химическими (ДСН-ПААГ, спектрофотометрия) методами, причем для каждого типа адъюванта-носителя, исходя из его химической природы, существуют специфические методы и условия его растворения (разрушения). В нашем исследовании показано использование двух методов: одного – для растворения цитратным буфером микрокристаллов, нагруженных антигенами LcrV и CafI; второго – для деградации полилактидных микрокапсул, несущих LcrV и CafI, метиленхлоридом и метанолом. Оба приема позволяли получить воспроизводимые результаты и определить содержание чумных антигенов в вакцинном препарате и его прототипе. Риккетсиозные антигены, прочно связывающиеся с гидроокисью алюминия, определяли по их остаточному количеству, анализируя содержимое фракций, свободных от микрочастиц гидроокиси алюминия.

Методы прямого количественного определения антигенов в составе препаратов, исключающих экстракцию, чрезвычайно привлекательны. В простом случае для количественного определения дозы антигена в вакцинном препарате на основе микрокапсул использовали специфическую метку, флуоресцеин-изотиоцианат (ФИТЦ), который вводили в CafI с образованием ковалентной связи [11]. Концентрацию связанного ФИТЦ определяли спектрофотометрически по характерному пику поглощения хромофорной флуоресцеиновой химической группы при 496 нм. Похожий подход применили

также О.Ю. Кочеткова с соавт. [12] для оценки эффективности включения ФИТЦ-меченного альбумина методом адсорбции в синтетические микрокапсулы в зависимости от числа полиэлектролитных слоев. Однако для характеристики содержания немеченых, нативных антигенов в партиях профилактических препаратов необходимо разработать полностью адекватную модель переноса и интерпретации модельных результатов поведения ФИТЦ-меченных антигенов с учетом того, сколько молекул метки вводится в антиген, меняя его заряд, гидрофобность и молекулярную массу. Дополнительные проблемы для прямого определения антигенов возникают, когда один из иммуногенных компонентов прототипа вакцинного препарата представляет собой не индивидуальный антиген, а, например, сложный антигенный комплекс, в основном белков и липополисахаридов [11]. Значения измеренных интегральных параметров антигенного комплекса должны полностью отражать его протективные иммунологические свойства, и очевидно, что получение доказательств адекватности и информативности характеристических параметров является отдельным трудоемким исследованием.

Прямые методы изучения белков в составе препаратов должны не только определять их количество, но и нести информацию для оценки качества профилактических препаратов, как самих антигенов, так и микроносителей (адъювантов). Дальнейшее накопление информации о свойствах субстанции субъединичных вакцин и их понимание можно применить к более сложным и перспективным прототипам, например к внеклеточным везикулам, нестабильная природа, сложная структура и состав которых создают трудности при их создании и изучении. Необходимо отметить, что уже в настоящее время рациональный дизайн создания вакцинных препаратов начинает строиться на основе полного понимания характеристик иммуногенных биочастиц [13–15]. Применение прямых аналитических методов при разработке вакцинных препаратов, таких как высокоэффективная хроматография, рассеяние лазерного света под разными углами, дифференциальная сканирующая калориметрия, флуоресценция, спектроскопия комбинационного рассеяния, необходимо для поиска решений по сохранению биологических функций вакцин, их количественного анализа, для описания их поведения при нарушении условий хранения с целью предотвращения от дезактивации или денатурации. Сочетание различных физико-химических методов и корреляция с анализами биологической и протективной активности *in vitro* или *in vivo* является будущей тенденцией развития, гарантирующей высокие темпы разработок, безупречное качество, безопасность и эффективность многих классов вакцинных препаратов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней».

Список литературы

1. Benne N., van Duijn J., Kuiper J., Jiskoot W., Slütter B. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *J. Control Release*. 2016; 234:124–34. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.05.033.
2. Baranov M.V., Kumar M., Sacanna S., Thutupalli S., van den Bogaart G. Modulation of immune responses by particle size and shape. *Front. Immunol.* 2021; 11:607945. DOI: 10.3389/fimmu.2020.607945.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.: 2018. С. 5326–36.
4. Воробьева С.А., Дуракова О.С., Громова О.В., Волох О.А., Клокова О.Д., Никифоров А.К. Антигенные компоненты холерной бивалентной химической вакцины, методы их выделения и контроля. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 2:12–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-12-19.
5. Копылов П.Х., Светоч Т.Э., Иванов С.А., Комбарова Т.И., Перовская О.Н., Титарева Г.М., Анисимов А.П. Особенности хроматографической очистки и протективности изоформ LcrV *Yersinia pestis*. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019; 55(5):471–80. DOI: 10.1134/S0555109919040081.
6. Дятлов И.А., Сомов А.Н., Дунайцев И.А., Копылов П.Х., Иванов С.А., Борзилов А.И., Анисимов А.П., Храмов М.В. Рекомбинантный вакцинный препарат пролонгированного действия для профилактики чумы у млекопитающих и человека и способ его получения. Патент РФ № 2671525 C2, опубл. 01.11.2018. Бюл. № 31.
7. Jones S., Asokanathan C., Kmiec D., Irvine J., Fleck R., Xing D., Moore B., Parton R., Coote J. Protein coated microcrystals formulated with model antigens and modified with calcium phosphate exhibit enhanced phagocytosis and immunogenicity. *Vaccine*. 2014; 32(33):4234–42. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.09.061.
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
9. Sheridan C. The business of making vaccines. *Nat. Biotechnol.* 2005; 23(11):1359–66. DOI: 10.1038/nbt1105-1359.
10. ICH – International Conference on Harmonisation Regulations. Q7 – GMP Guide for Active Pharmaceutical Ingredients; Q8(R2) – Pharmaceutical Development; Q9 – Quality Risk Management; Q10 – Pharmaceutical Quality System; Q11 – Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities). [Электронный ресурс]. URL: <https://www.gmppublications.com/product185.html> (дата обращения 14.12.2022).
11. Сомов А.Н., Дубровский А.В., Дунайцев И.А., Иванов С.А., Комбарова Т.И., Кочеткова О.Ю., Кравченко Т.Б., Титарева Г.М., Тихоненко С.А., Пинчук А.С., Фирстова В.В., Дентовская С.В. Иммуногенные свойства полиэлектролитных микрокапсул, нагруженных антигенами *Francisella tularensis* или *Yersinia pestis*. *Иммунология*. 2019; 40(5):52–61. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15006.
12. Кочеткова О.Ю., Казакова Л.И., Мошков Д.А., Винокуров М.Г., Шабарчина Л.И. Включение белков в полиэлектролитные микрокапсулы методами копреципитации и адсорбции. *Биоорганическая химия*. 2013; 39(5):565–71. DOI: 10.7868/S0132342313050084.
13. Herrington W.F. Jr., Singh G.P., Wu D., Barone P.W., Hancock W., Ram R.J. Optical detection of degraded therapeutic proteins. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):5089. DOI: 10.1038/s41598-018-23409-z.
14. Yang Y., Su Z., Ma G., Zhang S. Characterization and stabilization in process development and product formulation for super large proteinaceous particles. *Eng. Life Sci.* 2020; 20(11):451–65. DOI: 10.1002/elsc.202000033.
15. Буданова А.А., Шуковская Т.Н. Исследования *in silico* на этапах конструирования современных средств иммунопрофилактики чумы (на примере субъединичных вакцин). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:6–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-6-13.

References

1. Benne N., van Duijn J., Kuiper J., Jiskoot W., Slütter B. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *J. Control Release*. 2016; 234:124–34. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.05.033.
2. Baranov M.V., Kumar M., Sacanna S., Thutupalli S., van den Bogaart G. Modulation of immune responses by particle size and shape. *Front. Immunol.* 2021; 11:607945. DOI: 10.3389/fimmu.2020.607945.
3. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV edition. Vol. 4. Moscow; 2018. P. 5326–36.
4. Vorob'eva S.A., Durakova O.S., Gromova O.V., Volokh O.A., Klokova O.D., Nikiforov A.K. [Antigenic components of chemical bivalent cholera vaccine, methods of their isolation and control]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (2):1–19. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-12-19.
5. Kopylov P.Kh., Svetoch T.E., Ivanov S.A., Kombarova T.I., Perovskaya O.N., Titareva G.M., Anisimov A.P. [Features of chromatographic purification and protectivity of LcrV *Yersinia pestis* isoforms]. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya [Applied Biochemistry and Microbiology]*. 2019; 55(5):471–80. DOI: 10.1134/S0555109919040081.
6. Dyatlov I.A., Somov A.N., Dunaytsev I.A., Kopylov P.Kh., Ivanov S.A., Borzilov A.I., Anisimov A.P., Khramov M.V. [Recombinant vaccine preparation of prolonged action for the prevention of plague in mammals and humans and a method for its production]. RF Patent No. 2671525 C2, published November 01, 2018. Bulletin No. 31.
7. Jones S., Asokanathan C., Kmiec D., Irvine J., Fleck R., Xing D., Moore B., Parton R., Coote J. Protein coated microcrystals formulated with model antigens and modified with calcium phosphate exhibit enhanced phagocytosis and immunogenicity. *Vaccine*. 2014; 32(33):4234–42. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.09.061.
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
9. Sheridan C. The business of making vaccines. *Nat. Biotechnol.* 2005; 23(11):1359–66. DOI: 10.1038/nbt1105-1359.
10. ICH – International Conference on Harmonisation Regulations. Q7 – GMP Guide for Active Pharmaceutical Ingredients; Q8(R2) – Pharmaceutical Development; Q9 – Quality Risk Management; Q10 – Pharmaceutical Quality System; Q11 – Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities). (Cited 14 Dec 2022). [Internet]. Available from: <https://www.gmppublications.com/product185.html>.
11. Somov A.N., Dubrovsky A.V., Dunaytsev I.A., Ivanov S.A., Kombarova T.I., Kochetkova O.Yu., Kravchenko T.B., Titareva G.M., Tikhonenko S.A., Pinchuk A.S., Firstova V.V., Dentovskaya S.V. [Immunogenic properties of polyelectrolyte microcapsules loaded with *Francisella tularensis* or *Yersinia pestis* antigens]. *Immunologiya [Immunology]*. 2019; 40(5):52–61. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15006.
12. Kochetkova O.Yu., Kazakova L.I., Moshkov D.A., Vinokurov M.G., Shabarchina L.I. [Incorporation of proteins into polyelectrolyte microcapsules by co-precipitation and adsorption methods]. *Bioorganicheskaya Khimiya [Bioorganic Chemistry]*. 2013; 39(5):565–71. DOI: 10.7868/S0132342313050084.
13. Herrington W.F. Jr., Singh G.P., Wu D., Barone P.W., Hancock W., Ram R.J. Optical detection of degraded therapeutic proteins. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):5089. DOI: 10.1038/s41598-018-23409-z.
14. Yang Y., Su Z., Ma G., Zhang S. Characterization and stabilization in process development and product formulation for super large proteinaceous particles. *Eng. Life Sci.* 2020; 20(11):451–65. DOI: 10.1002/elsc.202000033.
15. Budanova A.A., Shchukovskaya T.N. [In silico research at the stages of designing modern means for prevention of plague (by the example of subunit vaccines)]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (3):6–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-6-13.

Authors:

Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V. State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Об авторах:

Копылов П.Х., Дентовская С.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, р.п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org.