DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-19-25

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 19–25
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 19–25

Высокомолекулярный гликоконъюгат нативного полисахарида *Haemophilus influenzae* типа b с белком-носителем CRM197: получение, физико-химическая и иммунологическая характеристика

П.А.Стряхнин, П.Г.Апарин, С.В.Коробова, И.Ю.Курбатова, Б.И.Алхазова, В.А.Ледов

ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация

Цель. Получить растворимый конъюгат нативного высокомолекулярного полирибозилрибитолфосфата (ПРФ) *Haemophilus influenzae* типа b с нетоксичным мутантным дифтерийным токсином – белком CRM197, без предварительной деполимеризации ПРФ, и оценить его физико-химические, антигенные и иммуногенные свойства.
Материалы и методы. Нативный ПРФ конъюгировали с белком CRM197. Продукт очищали на Sephacryl S-300 и характеризовали методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии с рефрактометрическим детектированием. Содержание ПРФ, белка, нуклеиновых кислот и бактериальных эндотоксинов определяли соответствующими аналитическими методами. Сохранность антигенных детерминант оценивали в прямом и конкурентном иммуноферментном анализе (ИФА). Иммуногенность конъюгата ПРФ-CRM197 исследовали на кроликах. Протективные свойства иммунного ответа на ПРФ-CRM197 оценивали по выживаемости иммунизированных конъюгатом лабораторных животных (мышей) после их экспериментального заражения бактерией *H. influenzae* типа b.
Результаты. Получен водорастворимый конъюгат ПРФ-CRM197. Массовое соотношение ПРФ и CRM197 в очищенном образце составляло 1:1. Содержание нуклеиновых кислот не превышало 0,1%, содержание бактериальных эндотоксинов составляло 7 ЭЕ/мг. В прямом и конкурентном ИФА подтверждена сохранность антигенных детерминант ПРФ и CRM197. После повторной иммунизации кроликов отмечено повышение титров Hib-специфических IgG-антител. У мышей, иммунизированных ПРФ-CRM197, выживаемость после заражения была выше, чем в контрольных группах.
Заключение. Прямая CDAP-конъюгация нативного высокомолекулярного ПРФ с CRM197 позволяет получить высокоочищенный, безопасный и растворимый гликоконъюгат, сохраняющий антигенные свойства обоих компонентов и проявляющий иммуногенность в экспериментах на лабораторных животных.
Ключевые слова: Haemophilus influenzae типа b, полирибозилрибитолфосфат, CRM197, гликоконъюгат, CDAP, эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография, иммуноферментный анализ, иммуногенность, вакцинация

Для цитирования: Стряхнин П.А., Апарин П.Г., Коробова С.В., Курбатова И.Ю., Алхазова Б.И., Ледов В.А. Высокомолекулярный гликоконъюгат нативного полисахарида *Haemophilus influenzae* типа b с белком-носителем CRM197: получение, физико-химическая и иммунологическая характеристика. Бактериология. 2026; 11(3): 19–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-19-25

High-molecular-weight glycoconjugate of *Haemophilus influenzae* type b native polysaccharide with CRM197 carrier protein: preparation and physicochemical and immunological characterization

P.A.Stryakhnin, P.G.Aparin, S.V.Korobova, I.Yu.Kurbatova, B.I.Alkhazova, V.A.Ledov

National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia, Moscow, Russian Federation

Objective. To obtain a soluble conjugate of native high-molecular-weight polyribosylribitol phosphate (PRP) from *Haemophilus influenzae* type b with a non-toxic mutant diphtheria toxin, the CRM197 protein, without prior depolymerization of the PRP and to evaluate its physicochemical, antigenic, and immunogenic properties.

Для корреспонденции:

Стряхнин Пётр Алексеевич, младший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин, ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России

Адрес: 115522, Москва, Каширское шоссе, 24

Статья поступила 01.09.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Petr A. Stryakhnin, Junior Researcher, Laboratory of Polysaccharide Vaccines, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia

Address: 24 Kashirskoye highway, Moscow, 115522, Russian Federation

The article was received 01.09.2026, accepted for publication 30.09.2026

Materials and methods. Native PRP was conjugated to the CRM197 protein. The product was purified on Sephacryl S-300 and characterized by size-exclusion HPLC with refractometric detection. The content of PRP, protein, nucleic acids, and bacterial endotoxins were determined using appropriate analytical methods. The integrity of antigenic determinants was assessed using direct and competitive ELISA. The immunogenicity of the PRP-CRM197 conjugate was studied in rabbits. The protective properties of the immune response to PRF-CRM197 were assessed by the survival rate of laboratory animals (mice) immunized with the conjugate after experimental infection with *H. influenzae* type b.
Results. A water-soluble PRF-CRM197 conjugate was obtained. The mass ratio of PRF to CRM197 in the purified sample was 1:1. The nucleic acid content did not exceed 0.1%, and the bacterial endotoxin content was 7 EU/mg. Direct and competitive ELISA confirmed the integrity of the antigenic determinants of PRF and CRM197. After booster immunization of rabbits, an increase in Hib-specific IgG antibody titers was observed. Mice immunized with PRF-CRM197 had higher survival after infection than control groups.
Conclusion. Direct CDAP conjugation of native high-molecular-weight PRP with CRM197 yields a highly purified, safe, and soluble glycoconjugate that retains the antigenic properties of both components and exhibits immunogenicity in animal models.
Key words: Haemophilus influenzae type b, polyribosylribitol phosphate, CRM197, glycoconjugate, CDAP, size-exclusion HPLC, ELISA, immunogenicity, vaccination

For citation: Stryakhnin P.A., Aparin P.G., Korobova S.V., Kurbatova I.Yu., Alkhazova B.I., Ledov V.A. High-molecular-weight glycoconjugate of *Haemophilus influenzae* type b native polysaccharide with CRM197 carrier protein: preparation and physicochemical and immunological characterization. Bacteriology. 2026; 11(3): 19–25. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-19-25

Капсульный полирибозилрибитолфосфат (ПРФ) *Haemophilus influenzae* типа b является основным антигеном Hib-вакцин. На ПРФ располагаются эпитопы для протективных антител. Антитела, индуцированные ПРФ-конъюгированными вакцинами, обладают высокой бактерицидной активностью [1]. Вместе с тем свободный ПРФ относится к Т-независимым антигенам и характеризуется недостаточной иммуногенностью у детей раннего возраста [2]. Для усиления иммунного ответа полисахарид ковалентно связывают с белками-носителями. Одним из наиболее широко применяемых носителей является CRM197 – нетоксичный вариант дифтерийного токсина [3, 4].

Физико-химические и иммуногенные свойства гликоконъюгатов зависят от нескольких взаимосвязанных параметров: структуры и длины углеводной цепи, способа ее активации, характеристик белка-носителя, соотношения полисахаридного и белкового компонентов, молекулярно-массового распределения продукта и доступности углеводных эпитопов [5–7]. Влияние каждого из этих факторов не является универсальным. Так, при исследовании ПРФ-олигосахаридов, содержавших в среднем 4, 6, 7 или 12 повторяющихся звеньев и унитерминально – только одним концом – связанных с CRM197, величина антительного ответа зависела не только от длины цепи, но и от степени коэффициента конъюгации белка с олигосахаридом [8].

В большинстве способов получения ПРФ-конъюгатов с CRM197 ПРФ предварительно подвергают контролируемой деполимеризации, после чего выделяют олигосахаридные или низкомолекулярные фракции и связывают их с белком-носителем [5, 8–11]. Использование укороченных цепей облегчает проведение реакции, очистку и стандартизацию продукта. Однако деполимеризация изменяет распределение полисахарида по длине цепей, уменьшает число повторяющихся звеньев в одной молекуле и увеличивает относительное содержание концевых групп. Поэтому результаты, полученные для олигосахаридных конъюгатов, нельзя без дополнительной проверки переносить на конъюгаты, содержащие нативный высокомолекулярный ПРФ.

Сохранение исходной длины полисахаридной цепи представляет альтернативный подход к получению ПРФ-гликоконъюгата. При активации ПРФ 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборатом реакционноспособные группы образуются на гидроксильных группах полисахарида и могут взаимодействовать с ε-аминогруппами лизиновых остатков белка без введения спейсера [12, 13]. Наличие нескольких потенциальных участков связывания вдоль протяженной цепи допускает образование высокомолекулярных белково-полисахаридных структур.

Работа с нативным высокомолекулярным ПРФ связана с технологическими сложностями. Многоточечное связывание может сопровождаться расширением молекулярно-массового распределения, образованием агрегатов и затруднением очистки от непрореагировавших компонентов. Поэтому сохранение высокой молекулярной массы ПРФ требует экспериментального подтверждения растворимости полученного продукта, определения его состава и молекулярно-размерных характеристик, а также оценки сохранности антигенных детерминант ПРФ и CRM197 [6, 11, 14, 15].

Ранее нами был разработан способ получения очищенного ПРФ *H. influenzae* типа b, пригодного для последующей конъюгации с белком-носителем [16]. В настоящей работе использовали нативный ПРФ со средневзвешенной молекулярной массой ~80 кДа, не подвергавшийся целенаправленной деполимеризации. Полисахарид активировали 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборатом (CDAP) и непосредственно связывали с CRM197, после чего продукт очищали эксклюзионной хроматографией. Полученный конъюгат исследовали физико-химическими и иммунохимическими методами, а его иммуногенные свойства оценивали на лабораторных животных.

Целью работы было получение растворимого конъюгата нативного высокомолекулярного ПРФ *H. influenzae* типа b с CRM197 без предварительной деполимеризации полисахарида, определение его состава и молекулярно-размерных характеристик, а также оценка сохранности антигенных детерминант, его иммуногенности и протективности иммунного ответа.

Материалы и методы

Культивирование H. influenzae типа b и получение ПРФ

Штамм *H. influenzae* 326 перед выращиванием в ферментере рассевали на твердую питательную среду на основе сердечно-мозгового бульона, содержащую 4 мг/л НАД и

10 мг/л гемина, для контроля морфологических свойств и чистоты культуры. Затем бактериальную культуру переносили в 350 мл жидкой питательной среды и выращивали 10–12 ч при 37°С. Полученной посевной культурой засевали ферментер рабочим объемом 10 л. Подлинность и чистоту инокулята подтверждали агглютинацией с Hib-специфической антисывороткой и окрашиванием по Граму.

ПРФ получали из культуральной жидкости по ранее описанной многостадийной схеме [16]. Культуральную жидкость центрифугировали при 12 000 g и 7°С в течение 60 мин, супернатант концентрировали тангенциальной ультрафильтрацией на мембранах с номинальным пределом отсечения 50 кДа («Владисарт»). Для удаления нуклеиновых кислот и белков проводили последовательную обработку эндонуклеазой, проназой Е, трипсином типа I и наргазой с последующей ультрафильтрацией. ПРФ осаждали цетавлоном по модифицированному методу Kuo [17]. Высокая степень очистки полисахарида была ранее подтверждена методом протонной ЯМР-спектроскопии [16, 18, 19]. Средневзвешенная молекулярная масса ПРФ составляла ~80 кДа.

Конъюгация ПРФ с CRM197

В качестве белка-носителя применяли CRM197 с молекулярной массой ~58,4 кДа [3, 4]. Гидроксильные группы полисахаридной цепи активировали CDAP [12, 13]. Реакцию останавливали добавлением глицина до конечной концентрации 50 мМ и инкубировали смесь 60 мин при 20°С.

Очистка конъюгата ПРФ-CRM197

Реакционную смесь очищали методом колоночной хроматографии низкого давления на Sephacryl S-300. Образец объемом 10 мл наносили на колонку и элюировали 0,2 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ) со скоростью 10 мл/ч. Элюат собирали фракциями по 10 мл. Во фракциях определяли содержание белкового и полисахаридного компонентов; фракции, соответствовавшие высокомолекулярной области и одновременно содержавшие ПРФ и CRM197, объединяли.

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Молекулярно-размерные характеристики очищенного конъюгата определяли на хроматографической системе Agilent 1260 Infinity II, оснащенной рефрактометрическим детектором. Разделение проводили на колонке Tosoh G-5000PWxl в изократическом режиме [14, 20, 21]. В качестве подвижной фазы использовали 0,2 М ФСБ с pH ~7,4. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин, объем вводимого образца – 100 мкл. Калибровочную зависимость строили по стандартам декстранов с молекулярной массой 2000, 670 и 70 кДа.

Количественное определение компонентов и примесей

Содержание полисахаридного компонента определяли по количеству рибозы орциновым методом в соответствии с ОФС 1.2.3.0019.15 ГФ XIV РФ. Содержание белка определяли с помощью набора QuantiTMBCA Assay Kit (Sigma). Содержание нуклеиновых кислот определяли методом Спирина согласно ОФС 1.7.2.0018.15 ГФ XIV РФ.

Определение содержания бактериальных эндотоксинов

Содержание бактериальных эндотоксинов в очищенном конъюгате определяли количественным ЛАЛ-тестом [22, 23]. Результат выражали в единицах эндотоксина на 1 мг конъюгата.

Оценка пирогенности

Пирогенность препарата оценивали отдельно на кроликах в соответствии с ОФС 1.2.4.0005.15 ГФ XIV РФ. Животным вводили препарат в дозе, соответствовавшей 1 мкг ПРФ на 1 кг массы тела, и регистрировали изменение температуры тела.

Получение гипериммунной сыворотки кролика к H. influenzae типа b

Кроликов породы шиншилла массой 2–2,5 кг предварительно исследовали на наличие нормальных антител к *H. influenzae*. Животных иммунизировали прогретой культурой *H. influenzae*, штамм 267. Через 2 нед. проводили три повторных цикла иммунизации живой культурой. По завершении цикла животных обескровливали и получали сыворотку.

Определение специфической активности в конкурентном иммуноферментном_анализе (ИФА)

На твердую фазу сорбировали конъюгат ПРФ с бычьим сывороточным альбумином (БСА) в концентрации 1 мкг/мл по ПРФ в карбонатно-бикарбонатном буферном растворе в течение 12–18 ч при комнатной температуре. Планшеты отмывали ФСБ, содержащим 0,05% Tween 20 (ФСБ-Т). В лунки вносили последовательные разведения ПРФ от 100 до 0,75 мкг/мл либо конъюгата ПРФ-CRM197 совместно с гипериммунной сывороткой кролика к ПРФ в 1%-м растворе БСА в ФСБ-Т. После инкубации в течение 1 ч при 37°С планшеты отмывали и вносили меченные пероксидазой антитела козы к IgG кролика (Sigma). После повторной инкубации и отмывки добавляли тетраметилбензидин (ТМБ). Через 15 мин реакцию останавливали 10%-м раствором серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при 450 нм.

Прямой ИФА для определения связывания антител с ПРФ и CRM197

Конъюгат ПРФ-CRM197 сорбировали на твердую фазу в карбонатно-бикарбонатном буферном растворе в течение 12–18 ч при комнатной температуре. После отмывки ФСБ-Т вносили стандартную сыворотку человека 09/222 (NIBSC), содержащую антитела к ПРФ, в разведении 1:100 либо отрицательную сыворотку человека; моноклональные антитела к *H. influenzae* clone 1079/457 и clone 1079/83 (Bio-Rad) либо мышиные моноклональные антитела к антигену CD7 человека [24]; поликлональную сыворотку кролика к дифтерийному токсину ab151222 (Abcam) либо сыворотку интактного кролика. После инкубации в течение 1 ч при 37°С планшеты отмывали и вносили соответствующие антитела: меченные пероксидазой антитела к IgG человека, мыши или кролика (Sigma). Реакцию проявляли ТМБ, останавливали 10%-м раствором серной кислоты и учитывали при 450 нм.

Иммунизация кроликов и определение Hib-специфических IgG-антител

Кроликам породы шиншилла дважды с интервалом 14 суток внутримышечно вводили конъюгат ПРФ-CRM197 в физиологическом растворе в дозе 10 мкг по ПРФ на животное. Кровь из краевой вены уха отбирали до иммунизации, на 14-е сутки после первого введения, а также на 14-е и 39-е сутки после второго введения.

Для определения титров антител на твердую фазу сорбировали ПРФ-БСА в карбонатно-бикарбонатном буферном растворе в течение 12–18 ч при комнатной температуре. После отмывки ФСБ-Т вносили двукратные разведения сывороток, начиная с 1:25. Связавшиеся IgG-антитела выяв-

ляли соответствующим конъюгатом антител, меченным пероксидазой (Sigma), с последующим использованием ТМБ. Оптическую плотность измеряли при 450 нм.

Оценка выживаемости иммунизированных мышей после экспериментального заражения H. influenzae типа b

Исследование проводили в соответствии с рекомендациями [25]. Мышей линии C57BL/6 (самцы) распределяли на 3 группы по 6 животных: контрольную, получавшую двукратно внутримышечно по 0,5 мл 0,9%-го раствора NaCl; опытную, получавшую двукратно по 0,5 мл конъюгата ПРФ-CRM197; группу препарата сравнения, получавшую двукратно по 0,5 мл вакцины Хиберикс®. Доза ПРФ в опытной группе и группе сравнения составляла 10 мкг на животное.

Через 14 суток после повторной иммунизации, на 29-е сутки после первого введения, мышей внутрибрюшинно заражали *H. influenzae* типа b. В отдельных опытах каждому животному вводили $4{\cdot}10^4$, $4{\cdot}10^5$ или $4{\cdot}10^6$ КОЕ в объеме 0,5 мл. За состоянием животных в первые сутки наблюдали постоянно, в последующие 14 суток – ежедневно. Результат выражали долей выживших животных от исходного числа в каждой группе.

Результаты исследования и их обсуждение

Получение и физико-химическая характеристика конъюгата ПРФ-CRM197

В результате CDAP-опосредованной конъюгации нативного высокомолекулярного ПРФ *H. influenzae* типа b с белком-носителем CRM197 был получен водорастворимый белково-полисахаридный комплекс. После очистки препарат представлял собой прозрачный раствор без видимого осадка.

Хроматография низкого давления на Sephacryl S-300 обеспечивала отделение целевого высокомолекулярного продукта от низкомолекулярных компонентов реакционной смеси и свободного белка-носителя. Фракции, одновременно содержавшие ПРФ и CRM197, объединяли.

По данным эксклюзионной ВЭЖХ (рис. 1) с рефрактометрическим детектированием очищенный образец характеризовался доминирующей высокомолекулярной фракцией. Основной пик элюировался в диапазоне 11,22–20,86 мин, максимальное время удерживания составляло 17,36 мин. Расчетное значение молекулярной массы в максимуме распределения основной фракции, определенное по калибровке декстранами, составляло 318 кДа. Полученное значение превышало молекулярную массу исходного ПРФ и CRM197,

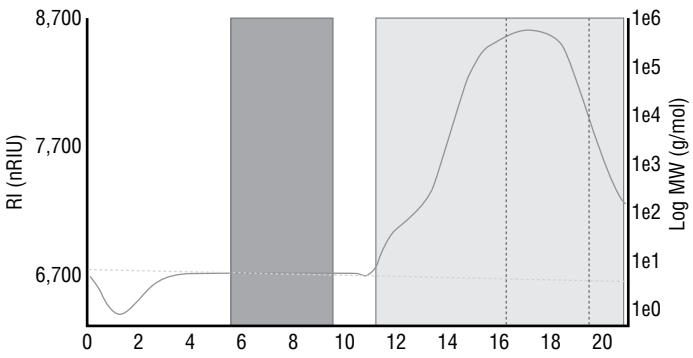

Рис. 1. **Хроматограмма конъюгата ПРФ-CRM197.**
Fig. 1. ***Chromatogram of the PRF-CRM197 conjugate.***

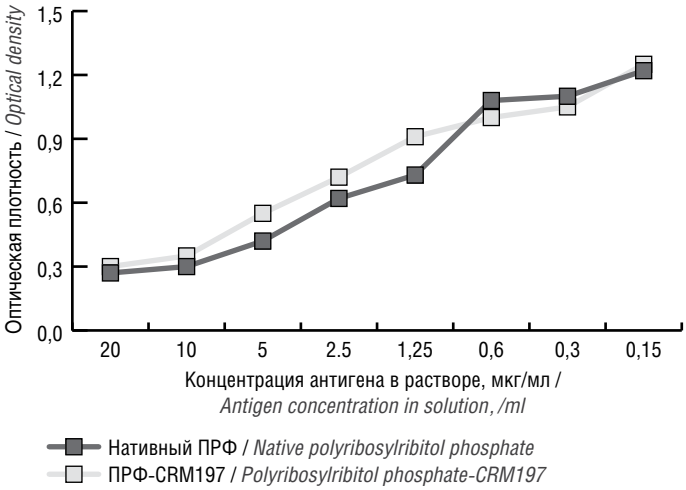

Рис. 2. **Реакция торможения в ИФА нативного ПРФ и конъюгата ПРФ-CRM197 с гипериммунной сывороткой кролика, содержащей антитела к *H. influenzae* типа b.**
Fig. 2. ***Inhibition reaction in an ELISA involving native PRP and a PRP-CRM197 conjugate, using rabbit hyperimmune serum containing antibodies against H. influenzae type b.***

что согласуется с образованием высокомолекулярного белково-полисахаридного продукта.

Количественное определение ПРФ и CRM197 в конъюгате показало, что их массовое соотношение в очищенном образце составляло 1:1. Содержание нуклеиновых кислот в очищенном конъюгате не превышало 0,1%.

Бактериальные эндотоксины и пирогенность

Содержание бактериальных эндотоксинов в очищенном конъюгате, определенное количественным ЛАЛ-тестом, составляло 7 ЭЕ/мг. В отдельном испытании на пирогенность суммарное повышение температуры тела кроликов после введения препарата составляло 0,1°С.

Иммунохимическая активность конъюгата ПРФ-CRM197

Торможение связывания ПРФ-специфических антител с сорбированным на твердой фазе ПРФ оценивали в конкурентном ИФА с использованием очищенного нативного ПРФ и конъюгата ПРФ-CRM197. Показано, что нативный ПРФ и ПРФ в составе конъюгата вызывали концентрационно-зависимое торможение связывания антител. С уменьшением концентрации растворимого антигена оптическая плотность возрастала. Кривые, полученные для нативного ПРФ и конъюгата ПРФ-CRM197, практически совпадали, что свидетельствует о сохранении распознаваемых антигенных детерминант ПРФ после конъюгации (рис. 2).

В прямом ИФА исследовали связывание специфических антител к полисахаридным и белковым компонентами конъюгата. Результаты представлены в табл. 1.

Оптическая плотность в лунках, где использовались специфические антитела, превышала оптическую плотность соответствующих отрицательных контролей в 3,8–13,8 раза. Полученные данные подтверждают специфическое распознавание как ПРФ, так и CRM197 в составе конъюгата и сохранность соответствующих антигенных детерминант после конъюгации.

Иммуногенность конъюгата ПРФ-CRM197

Для определения иммуногенности конъюгата ПРФ-CRM197 животных (кроликов) иммунизировали дважды с интервалом 2 нед. Наличие антител определяли после каж-

Таблица 1. **Связывание антител с ПРФ *H. influenzae* типа b и CRM197 в прямом ИФА**
Table 1. ***Antibody binding to H. influenzae type b PRP and CRM197 in direct ELISA***

Антитела / *Antibodies*	ОП отрицательный контроль / *OD Negative control*	ОП специфические антитела / *OD specific antibodies*
Референсная сыворотка человека, содержащая антитела к Hib (NIBSC) / *Human reference serum containing antibodies to Hib (NIBSC)*	0,570	2,385
Моноклональные антитела clone 1079/457 к *H. influenzae* (Bio-Rad) / *Monoclonal antibodies (clone 1079/457) against H. influenzae (Bio-Rad)*	0,078	1,080
Моноклональные антитела clone 1079/83 к *H. influenzae* (Bio-Rad) / *Monoclonal antibodies, clone 1079/83, against H. influenzae (Bio-Rad)*	0,078	0,296
Поликлональная сыворотка кролика, содержащая антитела к дифтерийному токсину (Abcam) / *Rabbit polyclonal serum containing antibodies against diphtheria toxin (Abcam)*	0,228	1,706

Таблица 2. **Титры антител к ПРФ *H. influenzae* типа b у кроликов, иммунизированных конъюгатом ПРФ-CRM197**
Table 2. ***Antibody titers to H. influenzae type b PRF in rabbits immunized with the PRF-CRM197 conjugate***

Животное / *Animal*	Первая иммунизация, 14-е сутки / *First immunization, day 14*	Вторая иммунизация, 14-е сутки / *Second immunization, day 14*	Вторая иммунизация, 39-е сутки / *Second immunization, day 39*
Кролик 1	1:50	1:200	1:25
Кролик 2	1:200	1:400	1:200
Кролик 3	1:25	1:200	1:100

дого введения. Показано, что ПРФ-специфические IgG-антитела обнаруживаются уже после первого введения конъюгата. На 14-е сутки после повторной иммунизации у всех трех животных титры антител были выше, чем после первого введения (табл. 2).

Таким образом, уже первое введение конъюгата ПРФ-CRM197 индуцировало образование ПРФ-специфических антител, а повторное сопровождалось повышением титров и выраженным буст-эффектом.

Протективные свойства иммунного ответа, вызванного иммунизацией конъюгатом ПРФ-CRM197

Для оценки способности конъюгата ПРФ-CRM197 индуцировать протективный иммунный ответ животных (мышей линии C57BL/6) предварительно двукратно иммунизировали ПРФ-CRM197. Далее проводили заражение различными дозами бактериями *H. influenzae* типа b и определяли выживаемость животных. Группами сравнения служили интактные мыши и мыши, которым вводилась коммерческая вакцина Хиберикс® (табл. 3).

После заражения дозой $4 \cdot 10^5$ КОЕ на животное в контрольной группе выживших животных не было, тогда как в группах ПРФ-CRM197 и Хиберикс® выживаемость составляла 50%. При увеличении инфицирующей дозы до $4 \cdot 10^6$ КОЕ смертность в контрольной группе достигала 100%, а в обеих иммунизированных группах – 83,3%, что соответствовало выживаемости 16,7%. При дозе $4 \cdot 10^4$ КОЕ выживаемость составляла 16,7% в контрольной группе и 66,7% в обеих иммунизированных группах. Таким образом, иммунизация ПРФ-CRM197 приводила к формированию иммунного ответа, сравнимого по эффективности с ответом на одобренный в клинической практике вакцинный препарат Хиберикс® и способного достоверно защитить от заражения бактериями *H. influenzae* типа b.

Обсуждение

Капсульный ПРФ *H. influenzae* типа b содержит углеводные эпитопы, определяющие специфичность антительного ответа, однако в свободной форме относится к Т-независимым антигенам и недостаточно эффективно индуцирует иммунитет у детей раннего возраста [2, 19, 26, 27]. Ковалентное связывание ПРФ с белком-носителем позволяет перевести иммунный ответ на Т-зависимый путь и сформировать стойкий гуморальный ответ с формированием клеток памяти.

Ранее при получении конъюгатов ПРФ с белком CRM197 применяли олигосахаридный подход. ПРФ подвергали контролируемому гидролизу, выделяли фрагменты заданной длины и затем связывали их с CRM197. Недостатком этого метода является то, что в процессе гидролиза могут повреждаться конформационные эпитопы [8–11].

Поэтому нами была проведена работа по получению конъюгата на основе нативного ПРФ. Был использован нативный ПРФ со средневзвешенной молекулярной массой ~80 кДа без предварительной деполимеризации. При CDAP-активации реакционноспособные группы формируются вдоль полисахаридной цепи, что создает возможность многоточечного связывания с белком-носителем [12, 13].

Выбранные условия конъюгации позволили получить растворимый продукт без видимого осадка. Расчетное значение молекулярной массы в максимуме распределения основной фракции, определенное по калибровке декстранами, составляло 318 кДа. Оно превышало молекулярную

Таблица 3. **Выживаемость мышей после двукратной иммунизации и экспериментального заражения *H. influenzae* типа b**
Table 3. ***Survival of mice following two-dose immunization and experimental infection with H. influenzae type b***

Группа / *Group*	Доза препарата / *Dose of preparation*	$4 \cdot 10^4$ КОЕ на животное / *$4 \cdot 10^4$ CFU per animal*	$4 \cdot 10^5$ КОЕ на животное / *$4 \cdot 10^5$ CFU per animal*	$4 \cdot 10^6$ КОЕ на животное / *$4 \cdot 10^6$ CFU per animal*
Контроль / *Control (n = 6)*	0,9% NaCl	16,7%	0%	0%
ПРФ-CRM197 (*n* = 6)	10 мкг ПРФ на животное / *10 μg PRF per animal*	66,7%	50%	16,7%
Хиберикс® (*n* = 6)	10 мкг ПРФ на животное / *10 μg PRF per animal*	66,7%	50%	16,7%

массу исходных компонентов и согласовывалось с образованием высокомолекулярного белково-полисахаридного продукта. Применяемый для подтверждения конъюгации метод эксклюзионной ВЭЖХ позволяет оценить лишь молекулярно-массовое распределение продукта, но не предоставляет информации о конформации антигенных детерминант [20, 28]. Поэтому сохранность антигенных детерминант ПРФ была подтверждена по их способности связываться с ПРФ-специфическими моно- и поликлональными антителами. Таким образом, проведенная химическая модификация не приводила к снижению распознавания антигенных детерминант ПРФ в составе конъюгата, что свидетельствует об их сохранности в процессах выделения, конъюгации и очистки.

Полученный конъюгат также обладал хорошей иммуногенностью и вызывал образование высоких титров специфических антител у лабораторных животных (кроликов). Важным свойством препарата стало наличие буст-эффекта: отмечался рост титров антител после второго введения, что является признаком формирования вторичного иммунного ответа и иммунологической памяти, характерных для ПРФ-конъюгированных вакцин [26, 29, 30].

Индуцированные на ПРФ-CRM197 антитела были способны достоверно защищать лабораторных животных от развития инфекции при их экспериментальном заражении бактериями *H. influenzae* типа b.

Кроме того, низкое содержание эндотоксинов и отсутствие пирогенности свидетельствуют о безопасности конъюгата.

Таким образом, совокупность полученных данных показывает, что нативный высокомолекулярный ПРФ может быть использован для прямой CDAP-конъюгации с CRM197 без предварительной деполимеризации [5, 8].

Заключение

Разработанный на основе нативного высокомолекулярного ПРФ конъюгата ПРФ-CRM197 демонстрирует антигенную сохранность и высокую иммуногенность. Данный вакцинный кандидат обеспечивает Т-зависимый гуморальный ответ, формирование иммунологической памяти и протективную защиту от *H. influenzae* типа b на уровне коммерческого аналога. Полученные результаты позволяют рассматривать ПРФ-CRM197 как перспективную основу для дальнейшей разработки отечественной кандидатной Hib-вакцины [5, 8].

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках научно-производственной программы предприятия Гритвак.

Funding

This study was conducted as part of the research and production program of Gritvak LLC.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература / References

1. Akeda Y, Koizumi Y, Takanami Y, Sumino S, Hattori Y, Sugizaki K, et al. Comparison of serum bactericidal and antibody titers induced by two *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines: A phase III randomized double-blind study. Vaccine. 2018 Mar 14;36(12):1528-1532. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.02.011
2. Cadoz M. Potential and limitations of polysaccharide vaccines in infancy. Vaccine. 1998;16(14-15):1391-1395. DOI: 10.1016/S0264-410X(98)00097-8
3. Shinefield HR. Overview of the development and current use of CRM197 conjugate vaccines for pediatric use. Vaccine. 2010;28(27):4335-4339. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.04.072
4. Bröker M, Costantino P, DeTora L, McIntosh EDG, Rappuoli R. Biochemical and biological characteristics of cross-reacting material 197 (CRM197), a non-toxic mutant of diphtheria toxin: Use as a conjugation protein in vaccines and other potential clinical applications. Biologicals. 2011;39(4):195-204. DOI: 10.1016/j.biologicals.2011.05.004
5. Rana R, Dalal J, Singh D, Kumar N, Hanif S, Joshi N, et al. Development and characterization of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine prepared using different polysaccharide chain lengths. Vaccine. 2015;33(23):2646-2654. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.04.031
6. Khatun F, Stephenson RJ, Toth I. An Overview of Structural Features of Antibacterial Glycoconjugate Vaccines That Influence Their Immunogenicity. Chemistry – A European Journal. 2017;23(18):4233-4254. DOI: 10.1002/chem.201603599
7. Wessels MR, Paoletti LC, Guttormsen HK, Michon F, D'Ambra AJ, Kasper DL. Structural properties of group B streptococcal type III polysaccharide conjugate vaccines that influence immunogenicity and efficacy. Infection and Immunity. 1998;66(5):2186-2192. DOI: 10.1128/IAI.66.5.2186-2192.1998
8. Anderson PW, Pichichero ME, Stein EC, Porcelli S, Betts RF, Connuck DM, et al. Effect of oligosaccharide chain length, exposed terminal group, and hapten

loading on the antibody response of human adults and infants to vaccines consisting of *Haemophilus influenzae* type b capsular antigen unterminally coupled to the diphtheria protein CRM197. J Immunol. 1989 Apr 1;142(7):2464-8.

9. Anderson P, Pichichero ME, Insel RA. Immunogens consisting of oligosaccharides from the capsule of *Haemophilus influenzae* type b coupled to diphtheria toxoid or the toxin protein CRM197. J of Clinical Investigation. 1985;76(1):52-59. DOI: 10.1172/JCI111976
10. Ravenscroft N, Averani G, Bartoloni A, Berti S, Bigio M, Carinci V, et al. Size determination of bacterial capsular oligosaccharides used to prepare conjugate vaccines. Vaccine. 1999 Jul 16;17(22):2802-16. DOI: 10.1016/s0264-410x(99)00092-4
11. Bolgiano B, Mawas F, Yost SE, Crane DT, Lemercinier X, Corbel MJ. Effect of physico-chemical modification on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide–CRM197 conjugate vaccines. Vaccine. 2001;19(23–24):3189-3200. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00024-X
12. Lees A, Nelson BL, Mond JJ. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. Vaccine. 1996;14(3):190-198. DOI: 10.1016/0264-410X(95)00195-7
13. Shafer DE, Toll B, Schuman RF, Nelson BL, Mond JJ, Lees A. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides. Vaccine. 2000;18(13):1273-1281. DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00370-9
14. Plumb JE, Yost SE. Molecular size characterization of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate vaccines. Vaccine. 1996;14(5):399-404. DOI: 10.1016/0264-410X(95)00202-C
15. Zhao J, Hu G, Huang Y, Huang Y, Wei X, Shi J. Polysaccharide conjugate vaccine: A kind of vaccine with great development potential. Chinese Chemical Letters. 2021;32(4):1331-1340. DOI: 10.1016/j.cclet.2020.10.013
16. Коробова СВ, Стряхнин ПА, Курбатова ИЮ, Казаков ИА, Разваляева НА, Анкудинов ИВ, и др. Получение и оценка качества полирибозилрибитолфосфата *Haemophilus influenzae* типа b – основного компонента вакцины против гемофильной инфекции. Бактериология. 2023;8(3):75-82. / Korobova SV, Stryakhnin PA, Kurbatova IYu, Kazakov IA, Razvalyayeva NA, Ankudinov IV, et al. Development and quality evaluation of the *Haemophilus influenzae* type b polyribozyl-ribitol-phosphate: the main component of the vaccine against hemophilian infection. Bacteriology. 2023;8(3):75-82. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-75-82 (In Russian).
17. Kuo J.-C. Isolation and purification of polyribosyl ribitol phosphate from Haemophilus influenzae type b. US4220717A. 1980.
18. Lemercinier X, Jones C. An NMR Spectroscopic Identity Test for the Control of the Capsular Polysaccharide from *Haemophilus influenzae* Type b. Biologicals. 2000;28(3):175-183. DOI: 10.1006/biol.2000.0255
19. World Health Organization. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series No 897. Annex 1. Geneva: WHO; 2000.
20. von Hunolstein C, Parisi L, Recchia S. A routine high-performance size-exclusion chromatography to determine molecular size distribution of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. Vaccine. 1999;17(2):118-125. DOI: 10.1016/S0264-410X(98)00166-2
21. Parisi L, von Hunolstein C. Determination of the molecular size distribution of *Haemophilus influenzae* type b–tetanus toxoid conjugate vaccines by size-exclusion chromatography. Journal of Chromatography A. 1999;847(1-2):209-211. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00287-3
22. Ochiai M, Kataoka M, Toyoizumi H, Kamachi K, Yamamoto A, Horiuchi Y. Evaluation of endotoxin content of diphtheria-tetanus-acellular pertussis combined (DTaP) vaccines that interfere with the bacterial endotoxin test. Vaccine. 2003 May 16;21(17-18):1862-6. DOI: 10.1016/s0264-410x(03)00006-9
23. Di Paolo A, Forti K, Anzalone L, Corneli S, Pellegrini M, Severi G, et al. First evaluation of endotoxins in veterinary autogenous vaccines produced in Italy by LAL assay. Biologicals. 2018;55:71-73. DOI: 10.1016/j.biologicals.2018.06.001.
24. Филатов АВ, Бачурин ПС, Маркова НА, Сурнакова НЕ. Панель моноклональных антител против антигенов лимфоцитов человека. Экспериментальная онкология. 1989;11(2):28-32. / Filatov AV, Bachurin PS, Markova NA, Surnakova NE. Panel' monoklonal'nykh antitel protiv antigenov limfotsitov cheloveka. Eksperimental'naya onkologiya. 1989;11(2):28-32. (In Russian).
25. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты). Часть 2-я. М.: Гриф и К, 2012;135. / Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanii lekarstvennykh sredstv (Immunobiologicheskie lekarstvennye preparaty). Chast' 2-ya. M.: Grif i K, 2012;135. (In Russian).
26. Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. Immunology. 2004;113(2):163-174. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004. 01971.x
27. Sun X, Stefanetti G, Berti F, Kasper DL. Polysaccharide structure dictates mechanism of adaptive immune response to glycoconjugate vaccines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2019;116(1):193-198. DOI: 10.1073/pnas.1816401115
28. Patkowski A, Bujalowski W, Chu B, Schneerson R, Robbins JB. Light-scattering spectroscopic study of polysaccharide protein conjugate. Biopolymers. 1982;21(8):1503-1520. DOI: 10.1002/bip.360210804
29. Granoff DM, Holmes SJ. Comparative immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate vaccines. Vaccine. 1991;9(Suppl):S30-S34. DOI: 10.1016/0264-410X(91)90178-9
30. Nolan T, Altmann A, Skeljo M, Streeton C, Schuerman L. Antibody persistence, PRP-specific immune memory, and booster responses in infants immunised with a combination DTPa-HBV-IPV/Hib vaccine. Vaccine. 2004;23(1):14-20. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.06.017

Информация о соавторах:

Коробова Светлана Вячеславовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин, ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России
ORCID: 0009-0005-3319-7668

Курбатова Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории препаративной биохимии антигенов, ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России

Ледов Владимир Алексеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин, ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России

Апарин Пётр Геннадьевич, доктор медицинских наук, зав. лабораторией полисахаридных вакцин, ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России
ORCID: 0000-0001-7899-2626

Алхазова Биана Игоревна, младший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ГНЦ ФГБУ «НМИЦ аллергологии и иммунологии» ФМБА России

Information about co-authors:

Svetlana V. Korobova, PhD in Biological Sciences, senior scientist, laboratory of polysaccharide vaccines, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia
ORCID: 0009-0005-3319-7668

Irina Yu. Kurbatova, PhD in Biological Sciences, senior scientist, laboratory of antigen preparative biochemistry, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia

Vladimir A Ledov, PhD, MD, leading scientist, laboratory of polysaccharide vaccines, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia

Petr G. Aparin, MD, PhD, DSc, head of polysaccharide vaccines laboratory, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia
ORCID: 0000-0001-7899-2626

Biana I. Alkhazova, Junior Researcher, laboratory of Polysaccharide Vaccine, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency (FMBA) of Russia