

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ ПРОТОТИПА РЕКОМБИНАНТНОЙ СИБИРЕЯЗВЕННОЙ ВАКЦИНЫ ТРЕБОВАНИЯМ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫМ К ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

Н.И. Микшис, А.П. Семакова, П.Ю. Попова, О.М. Кудрявцева, С.А. Бугоркова, А.В. Комиссаров, В.Г. Германчук, Ю.А. Попов

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия

Резюме. Современный ареал сибирской язвы сельскохозяйственных и диких животных охватывает почти все континенты. Причиной заболевания людей традиционно является контакт с заболевшим животным в процессе ухода за ним, вынужденного его убоя или последующей разделки туши, контакт с инфицированным сырьем животного происхождения. Лицензированные вакцины внесли неоценимый вклад в улучшение эпидемиологической ситуации по сибирской язве, тем не менее, сохраняется актуальность создания вакцин, соответствующих современному уровню науки. Нами разработан прототип вакцины, содержащий рекомбинантный протективный антиген и белок S-слоя EA1, в рецептуру прототипа вакцины включен современный адъювант CpG 2006, показано преимущество лиофилизированной формы препарата. Цель исследования: получение лиофилизированной формы прототипа сибиреязвенной вакцины и проведение анализа соответствия основным требованиям, предъявляемым к вакцинным препаратам. *Материалы и методы.* Выделение рПА и белка EA1 осуществляли из штамма-продуцента *B. anthracis* 55ΔTPA-1Sp⁺ в единой технологической линии, включающей этапы концентрирования, диафильтрации и двухступенчатой хроматографии. Адъювант CpG 2006 синтезировали по известным последовательностям. Компоненты смешивали, лиофилизировали в сублимационной установке. В качестве криопротекторов использовали комбинацию 1% сахарозы и 3% глицина. Иммунизацию лабораторных животных осуществляли подкожно двукратно с интервалом в 2 недели. Эффективность и безопасность препарата оценивали на мышах BALB/c и морских свинках на основе иммунологических, морфометрических и гистологических исследований. Титры антител в сыворотках иммунизированных животных определяли с использованием стандартных процедур твердофазного иммуноферментного анализа. Протективные свойства изучали, определяя величину LD₅₀ тест-заражающего штамма для иммунизированных и контрольных животных и индекс иммунитета. *Результаты.* Проведено комплексное исследование прототипа вакцины сибиреязвенной химической, содержащего в качестве основного и дополнительного антигенов выделенные из штамма *B. anthracis* 55ΔTPA-1Sp⁺ белки, а также адъювант CpG 2006 и стабилизаторы. По физико-химическим свойствам прототип отвечает требованиям к иммунобиологическим лекарственным препаратам, он не оказывает токсического действия на организм лабораторных животных при подкожном и внутрибрюшинном введении им одной человеческой дозы. Патоморфологические исследования органов морских свинок, иммунизированных двукратно прототипом вакцины, не выявили свидетельств повреждающего действия на клетки и ткани макроорганизма. Установлено, что прототип вакцины защищает линейных мышей при заражении тест-штаммом *B. anthracis* 71/12.

Ключевые слова: *Vacillus anthracis*, сибирская язва, сибиреязвенные вакцины, рекомбинантные вакцины, протективный антиген, адъюванты, лиофилизация.

Адрес для переписки:

Микшис Наталья Ивановна
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (8452) 26-21-31 (служебн.).
E-mail: Mikshis_N@mail.ru

Contacts:

Nataliya I. Mikshis
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46,
Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe".
Phone: +7 (8452) 26-21-31 (office).
E-mail: Mikshis_N@mail.ru

Библиографическое описание:

Микшис Н.И., Семакова А.П., Попова П.Ю., Кудрявцева О.М., Бугоркова С.А., Комиссаров А.В., Германчук В.Г., Попов Ю.А. Определение соответствия прототипа рекомбинантной сибиреязвенной вакцины требованиям, предъявляемым к иммунобиологическим препаратам // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 388–392. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-388-392

Citation:

Mikshis N.I., Semakova A.P., Popova P.Yu., Kudryavtseva O.M., Bugorkova S.A., Komissarov A.V., Germanchuk V.G., Popov Yu.A. Compliance of anthrax recombinant vaccine prototype with the requirements to immunobiological preparations // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 388–392. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-388-392

COMPLIANCE OF ANTHRAX RECOMBINANT VACCINE PROTOTYPE WITH THE REQUIREMENTS TO IMMUNE-BIOLOGICAL PREPARATIONS

Mikshis N.I., Semakova A.P., Popova P.Yu., Kudryavtseva O.M., Bugorkova S.A., Komissarov A.V., Germanchuk V.G., Popov Yu.A.

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. Current areal of anthrax among live stock and wild animals covers almost all the continents. The cause of human infection is conventionally considered to be the contact with diseased animals in the process of carrying for an animal, forced slaughter or further trimming of carcasses, as well as contact with infected raw materials of animal origin. Licensed vaccines has made an invaluable contribution to the improvement of epidemiological situation on anthrax, however, development of the vaccines complying with current scientific progress remains relevant. We have constructed a vaccine prototype containing recombinant protective antigen and S-layer EA1 protein and added state-of-the-art CpG 2006 adjuvant to the formulation. We have demonstrated the advantage of the lyophilized form of the preparation. Objective — obtainment of anthrax vaccine prototype in lyophilized state and assessment of the prototype compliance with the requirements to vaccine preparations. *Materials and methods.* Isolation of rPA and EA1 protein was carried out using producer-strain *B. anthracis* 55ΔТПА-1Spo⁻ on an integrated end-to-end manufacturing line, including concentration, diafiltration and two-phase chromatography. CpG 2006 adjuvant was synthesized according to known sequences. Components were mixed and lyophilized in sublimation unit. Combination of 1% sucrose and 3% glycine was used as cryoprotector. Effectiveness and safety of the preparation were evaluated on the model of BALB/c mice and guinea pigs applying immunological, morphometric, and histological assays. Antibody titers in sera of immunized animals were evaluated using standard ELISA procedures. Protective properties were investigated through LD₅₀ values for the test-strain used on immunized and control animals and immunity index. *Results.* We have performed complex investigation of the anthrax vaccine prototype, containing *B. anthracis* 55ΔТПА-1Spo⁻ proteins as main and supplementary antigens, as well as CpG 2006 adjuvant, stabilizers and preservative agent. The prototype meets the requirements to immunobiological medicinal drugs by all physical-chemical properties. Our preparation does not have a toxic effect on the organism of laboratory animals in case of subcutaneous and intraperitoneal administration of single human dose. Pathomorphological study of guinea pigs' organs immunized with double dose of the vaccine prototype has not revealed any evidence of damaging effect on the cells and tissues of macroorganism. The prototype protects BALB/c mice from the infection with *B. anthracis* 71/12 test-strain.

Key words: *Bacillus anthracis*, anthrax, anthrax vaccine, recombinant vaccine, protective antigen, adjuvants, lyophilization.

Введение

Несмотря на значительное улучшение эпидемиологической обстановки по сибирской язве, ежегодно в России регистрируют случаи особо опасного заболевания среди людей и восприимчивых животных. Одним из основных факторов риска является наличие на территории страны большого количества скотомогильников. В 2016 г. в Ямало-Ненецком автономном округе возникла крупная эпизоотия среди оленей, на этом фоне были зарегистрированы случаи заболевания людей, в том числе со смертельным исходом. Ликвидация последствий потребовала значительного вложения средств и ресурсов [5]. Не исключена возможность завоза инфицированного сырья животного происхождения, использования микроорганизма в террористических целях.

Эффективной превентивной мерой в отношении сибирской язвы является вакцинопрофилактика сельскохозяйственных животных и населения, входящего в группы риска. В России для иммунопрофилактики сибирской язвы у людей используют живую вакцину отечественного производства на основе штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1. За рубежом лицензировано производство химических вакцин AVA (США) и AVP (Великобритания) [11]. Лицензированные вакцины внесли неоценимый вклад в улучшение эпидемиологической ситуации по сибирской язве, тем не менее сохраняется актуальность создания вакцин, соответствующих современному уров-

ню науки. В значительной мере решает проблему остаточной вирулентности и реактогенности вакцин создание препаратов на основе иммуногенных антигенов, синтезируемых рекомбинантными продуцентами, но продукты геномных технологий обладают недостаточной иммуногенностью вследствие отсутствия у них патоген-ассоциированных молекулярных структур микроорганизмов, взаимодействующих с рецепторами врожденного иммунитета. Следовательно, вакцины на основе рекомбинантных иммуногенных антигенов должны содержать в своем составе адъюванты, неспецифически усиливающие иммунный ответ организма [7]. При выборе адъюванта принимается во внимание его биосовместимость с организмом человека, способность стимулировать опосредованный через толл-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR) врожденный иммунитет. На сегодняшний день существует ограниченный ряд адъювантов, разрешенных к применению на людях или входящих в состав допущенных до клинических испытаний вакцин. К разряду последних относится бактериальная ДНК с высоким содержанием CpG мотивов [8, 10]. При разработке и производстве средств иммунопрофилактики важной задачей является обеспечение стабильности медико-биологических свойств препаратов. Правильный выбор среды высушивания и методических аспектов процесса лиофилизации позволяет увеличить срок годности препарата и свести к минимуму изменение основных характеристик [9].

Ранее нами был создан прототип вакцины сибиреязвенной химической, включающий в качестве иммуногенных компонентов рекомбинантный протеиновый антиген (рПА) и белок S-слоя EA1. Запатентован биологически безопасный и эффективный способ получения иммуногенных антигенов в одном технологическом цикле из генно-инженерного аспорогенного штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp⁻. Антигены охарактеризованы с использованием биохимических, иммунохимических, электронно-микроскопических и иммуномикроскопических методов исследования. Эксперименты на различных биомоделях показали иммунологическую эффективность и безопасность очищенных белковых антигенов [3]. Целью настоящего исследования было получение лиофилизированной формы прототипа сибиреязвенной вакцины и проведение анализа его соответствия основным требованиям, предъявляемым к вакцинным препаратам.

Материалы и методы

В работе использовали тест-заражающий штамм *B. anthracis* 71/12 (2-я вакцина Ценковского), рекомбинантный аспорогенный штамм-продуцент *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp⁻ (KM97) (Государственная коллекция патогенных бактерий, г. Саратов). Эксперименты проводили на мышах линии BALB/c (20±2 г) и морских свинках (300±20 г) (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов) в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Выделение рПА и белка EA1 осуществляли из аспорогенного генно-инженерного штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp⁻ согласно разработанному ранее способу [3]. Синтез CpG 2006 осуществляли в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора твердофазным фосфорамидитным способом на автоматическом синтезаторе ASM-800 (Биосет, Россия). В качестве окислителя использовали раствор сульфонирующего реактива 3Н 1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксида (Sigma, США). Лиофилизацию проводили в сублимационной сушильной установке Epsilon-2-6 (Martin Christ, Германия). Определение физико-химических свойств прототипа вакцины — дисперсность, герметичность, стерильность, потерю массы при высушивании и рН растворенного препарата осуществляли в соответствии с соответствующими разделами Государственной Фармакопеи Российской Федерации, 12 изд. и МУК 4.1/4.2.588-96 [1, 4]. Определение аномальной токсичности прототипа вакцины осуществляли по ОФС 42-0060-07. Испытание проводили на 10 белых аутбредных мышах и 5 морских свинках. В течение 7 сут проводили осмотр и взвешивание животных. Для определения токсичности по морфологическим показателям иммунизированных морских свинок умерщвляли хлороформом в установленные сроки (по 3 особи на срок). Обработку гистологического материала осуществляли по стандартной методике [2], готовые полу-

тонкие срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Материал просматривали в биологическом микроскопе Olympus CX31 при увеличении в 40–200 раз. Морфометрические характеристики оценивали с помощью денситоморфометрической программы аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц (версия 2.1.0.0). Определение титров антител в сыворотках иммунизированных животных с использованием стандартной процедуры твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве антигена применяли очищенный рПА в концентрации 30 мкг/мл. Иммунизацию лабораторных животных (по 20 особей в группе) осуществляли подкожно, двукратно с интервалом в 2 недели. Через 21 день от последней инъекции всех иммунизированных биомоделей заражали тест-штаммом *B. anthracis* 71/12. Линейным мышам вводили по 0,2 мл споровой взвеси тест-штамма в дозах от 1×10^2 до 1×10^5 спор (по 5 иммунизированных особей на дозу). Наблюдение за зараженными животными осуществляли в течение 10 дней. Гибель лабораторных животных от сибиреязвенной инфекции подтверждали данными контрольного вскрытия и результатами высева материала из органов на питательные среды. Вычисляли значения LD₅₀ тест-штамма. Индексы иммунитета определяли как отношение значений LD₅₀ тест-штамма для иммунизированных и интактных животных. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с применением стандартных методов.

Результаты и обсуждение

В качестве единого источника иммуногенных сибиреязвенных антигенов — рПА и EA1, использовали безопасный и эффективный штамм-продуцент *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp⁻. Выделение рПА осуществляли из стерильного культурального фильтрата, а белок EA1 экстрагировали из части концентрированной биомассы. Используемые в качестве адьюванта последовательности CpG 2006 были синтезированы нами по опубликованным последовательностям.

На следующем этапе компоненты вакцины смешивали таким образом, чтобы на 1 мг очищенного рПА приходилось 500 мкг белка EA1, 4 мг CpG 2006, 0,001% формальдегида. Полуфабрикат стерилизовали через стерилизующие фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. В качестве криопротекторов использовали комбинацию 1% сахарозы и 3% глицина. Фасовку препарата в объеме 100 мл проводили с использованием автоматического дозатора во флаконы вместимостью 10 мл. В каждый флакон вносили по 2,5 см³ препарата. Данный объем эквивалентен 5 человеко-дозам. Одна человеко-доза прототипа вакцины для подкожного введения содержит в объеме 0,5 см³ (50±2) мкг рПА, (25±2) мкг белка EA1, (0,2±0,05) мг CpG 2006, (5±0,5) мг сахарозы, (15±2) мг глицина и (0,001±0,0005)% формальдегида.

Лиофильное высушивание проводили в присутствии 1% сахарозы и 3% глицина, так как предварительными экспериментами было показано,

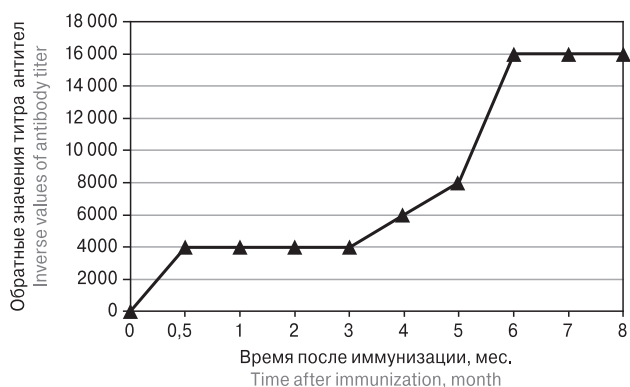


Рисунок. Динамика титров антител в сыворотках морских свинок, иммунизированных прототипом сибиреязвенной химической вакцины

Figure. Antigen titers in sera of guinea pigs immunized with the chemical anthrax vaccine prototype

что при условии использования данных криопротекторов сибиреязвенные антигены сохраняют свои иммуногенные свойства в течение года в условиях хранения при температуре 4°C [6].

Полученный в результате препарат прототипа вакцины сибиреязвенной химической представляет собой пористую массу в виде таблетки молочно-белого цвета. Содержимое флакона растворяется в течение 30 с в 0,9% растворе натрия хлорида при встряхивании. Растворенный препарат — прозрачная жидкость без посторонних примесей и хлопьев, свободно проходит в шприц через иглу № 0840, рН — 7,2. Потеря массы при высушивании — не более 2%.

В соответствии с требованиями к иммунобиологическим препаратам прототип вакцины сибиреязвенной химической тестировали на аномальную токсичность. Для этого белым аутбредным мышам вводили внутривенно 1 человеко-дозу, что соответствует 5 дозам, определенным для этого вида лабораторных животных. Морским свинкам вводили подкожно 1 человеко-дозу, что эквивалентно 2 дозам для данной биомодели. В течение срока наблюдения все животные были живы, ни у одного из них не выявлено видимых признаков интоксикации. Масса тела в день окончания наблюдения не уменьшилась по сравнению с исходной, за время наблюдения отмечен естественный прирост массы тела мышей и морских свинок. В месте введения препарата ни у одной биомодели не отмечали изъязвлений, абсцессов, некрозов, выраженного отека окружающей клетчатки и кровоизлияний.

Для морских свинок дополнительно проводили патоморфологическое исследование. Биомодели иммунизировали подкожно 1 человеко-дозой прототипа вакцины двукратно (по ½ человеко-дозы на инъекцию), с интервалом 14 дней. Затем животных разных групп умерщвляли на 7, 14 и 34 сут после второй иммунизации, вскрывали и забирали образцы органов для патогистологического исследования. В месте введения препарата незначительный инфильтрат отмеча-

ли только непосредственно после иммунизации. В миокарде не было видимых изменений во все сроки наблюдения. В легких на 7 сут отмечали незначительное скопление клеточных элементов (лимфо-гистиоцитарные узелки) около сосудов, а также умеренные признаки активации — наличие бластов. На протяжении всего исследования воздушность легочной ткани не была нарушена, а минимальные эффекты были обусловлены способом умерщвления животных. Незначительные явления в надпочечниках также укладывались в картину стресс-реакции макроорганизма на вводимый препарат и были обратимы. На 7 сут отмечали очаговые участки дезорганизации коркового вещества, умеренное полнокровие сосудов мозгового вещества, на 14 сут — незначительное полнокровие сосудов пучковой зоны коркового вещества, умеренное снижение феохромии мозгового вещества. Общую направленность изменений стромы паренхиматозных органов (печень, почки) характеризовало умеренное полнокровие сосудов с уменьшением выраженности к 34 сут. Почти двукратное превышение количества клеток Купфера в тканях печени подтверждало функциональную активацию ретикулоэндотелиальной системы. При гистологическом исследовании регионарных, отдаленных лимфатических узлов и селезенки отмечали признаки активации иммунной системы — умеренную гиперплазию фолликулярных структур с признаками клеточной активации Т- и В-зон. В целом патоморфологические исследования органов морских свинок, иммунизированных двукратно прототипом вакцины сибиреязвенной химической, не выявили каких-либо свидетельств повреждающего действия на клетки и ткани макроорганизма.

Для определения титров антител к протективному антигену морских свинок двукратно иммунизировали 1 человеко-дозой (по ½ человеко-дозы на инъекцию). Титры антител были 1:4000 уже через 2 недели после иммунизации. Наиболее высокие значения (1:16 000) отмечали в период от 6 до 8 месяцев наблюдения.

Протективную активность прототипа вакцины сибиреязвенной химической определяли в эксперименте на мышях линии BALB/c. Лабораторных животных иммунизировали однократно ½ человеко-дозы. Значения LD₅₀ тест-заражающего штамма *B. anthracis* 71/12 для иммунизированных и контрольных животных отличались на два порядка — $7,9 \times 10^4$ (15849 ÷ 501187) и $7,9 \times 10^2$ (158 ÷ 3981) соответственно. Для данной биомодели индекс иммунитета составил 100, что соответствует требованиям для данного вида биомоделей.

Таким образом, лиофилизированный препарат прототипа вакцины сибиреязвенной химической представляет собой пористую массу в виде таблетки молочно-белого цвета, хорошо растворимой в воде, он не оказывает токсического действия на организм лабораторных животных при подкожном и внутривенном введении им одной человеко-дозы и защищает

линейных мышей при заражении тест-штаммом *B. anthracis* 71/12. Важно, что иммуногенные компоненты прототипа вакцины — рПА и белок S-слоя EA1, охарактеризованы и подлежат

стандартизации. Разработанный прототип сибиреязвенной вакцины и технология его производства соответствует современному состоянию проблемы и мировым аналогам.

Список литературы/References

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации. 12-е изд. Часть 1. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. 704 с. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 12th ed. Part 1. M., Scientific Center for Expertise of Medical Applications, 2008. 704 p.]
2. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. М.: СпецЛит., 2010. 96 с. [Korzhevsky D.E., Gilyarov A.V. Osnovy gistologicheskoi tekhniki [Fundamentals of histological technique]. Moscow, SpetsLit, 2010. 96 p.]
3. Микшис Н.И., Попова П.Ю., Семакова А.П., Кудрявцева О.М., Бугоркова С.А., Кравцов А.Л. Изучение влияния антигенов, полученных из рекомбинантного штамма *B. anthracis* 55ΔTnA-1Sp^o-, на органы и ткани иммунизированных животных // Биотехнология. 2017. Т. 33, № 5. С. 45–60. Mikshis N.I., Popova P.Yu., Semakova A.P., Kudryavtseva O.M., Bugorkova S.A., Kravtsov A.L. Effect of antigens obtained from *Bacillus anthracis* 55ΔTnA-1Sp^o-recombinant strain on organs and tissues of immunized animals. *Biotechnologia = Biotechnology*, 2017, vol. 33, no. 5, pp. 45–60. doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-45-60 (In Russ.)
4. МУК 4.1/4.2.588-96. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. М.: 1996. 88 с. [MUK 4.1/4.2.588-96. Methods of controlling medical immunobiological drugs administered to people. M., 1996. 88 c.]
5. Попова А.Ю., Демина Ю.В., Ежлова Е.Б., Куличенко Н.К., Рязанова А.Г., Малеев В.В., Плоскирева А.А., Дятлов И.А., Тимофеев В.С., Нечепуренко Л.А., Харьков В.В. Вспышка сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г., эпидемиологические особенности // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 4. С. 42–46. [Popova A.Yu., Demina Yu.V., Ezhlova E.B., Kulichenko A.N., Ryazanova A.G., Maleev V.V., Ploskireva A.A., Dyatlov I.A., Timofeev V.S., Nechepurenko L.A., Khar'kov V.V. Outbreak of anthrax in the Yamalo-Nenets autonomous district in 2016, Epidemiological peculiarities. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2016, no. 4, pp. 42–46. doi: 10.21055/0370-1069-2016-4-42-46 (In Russ.)]
6. Семакова А.П., Кудрявцева О.М., Попова П.Ю., Комиссаров А.В., Микшис Н.И. Стабилизация путем лиофилизации иммуногенных антигенов *Bacillus anthracis* в составе прототипа рекомбинантной вакцины против сибирской язвы // Биотехнология. 2017. Т. 33, № 3. С. 57–65. [Semakova A.P., Kudryavtseva O.M., Popova P.Yu., Komissarov A.V., Mikshis N.I. Stabilization by freeze-drying of *Bacillus anthracis* immunogenic antigens as a component of anthrax recombinant vaccine prototype. *Biotechnologia = Biotechnology*, 2017, vol. 33, no. 3, pp. 57–65. doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-57-65 (In Russ.)]
7. Семенов Б.Ф., Зверев В.В., Хайтов Р.М. Прогноз развития вакцинопрофилактики в первые десятилетия XXI века // Иммунология. 2009. № 6. С. 324–335. [Semenov B.F., Zverev V.V., Khaitov R.M. Prognosis of the development of vaccine prevention in the first decades of the XXI century. *Immunologiya = Immunology*, 2009, no. 6, pp. 324–335. (In Russ.)]
8. Bode C., Zhao G., Steinhagen F., Kinjo T., Klinman D.M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert. Rev. Vaccines*, 2011, vol. 10, no. 4, pp. 499–511. doi: 10.1586/erv.10.174
9. Kristensen D., Chen D. Stabilization of vaccines: lessons learned. *Hum. Vaccines*, 2003, no. 6, pp. 229–231.
10. Minang J., Inglefield J., Harris A., Lathey J.L., Alleva D.G., Sweeney D.L., Hopkins R.J., Lacy M.J., Bernton E.W. Enhanced early innate and T cell-mediated responses in subjects immunized with anthrax vaccine adsorbed plus CPG 7909 (AV7909). *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 50, pp. 6847–6854. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.01.096
11. Williamson E., Dyson E. Anthrax prophylaxis recent advances and future directions. *Front. Microbiol.*, 2015, vol. 6: e1009. doi: 10.3389/fmicb.2015.01009

Авторы:

Микшис Н.И., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Семакова А.П., к.б.н., старший научный сотрудник отдела экспериментальных животных с виварием ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Попова П.Ю., к.м.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Кудрявцева О.М., к.м.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Бугоркова С.А., д.м.н., зав. отделом иммунологии ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Комиссаров А.В., д.м.н., доцент, зав. отделом экспериментальных фармацевтических форм ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Германчук В.Г., д.м.н., доцент, зав. отделом экспериментальных животных с виварием ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Попов Ю.А., д.м.н., профессор, зав. отделом образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия.

Authors:

Mikshis N.I., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher of Immunology Department, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Semakova A.P., PhD (Biology), Senior Research Officer of the Department of Experimental Animals with Vivarium, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Popova P.Yu., PhD (Medicine), Senior Researcher of Immunology Department, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Kudryavtseva O.M., PhD (Medicine), Senior Research Officer of Immunology Department, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Bugorkova S.A., PhD, MD (Medicine), Chief Research Officer, Head of Immunology Department, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Komissarov A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Experimental Pharmaceutical Forms, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Germanchuk V.G., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Experimental Animals with Vivarium, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Popov Yu.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Educational Programmes and Training of Specialists, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation.